

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin II
Sektion Kinder-Pneumologie
Geschäftsführende Direktorin: Prof. Dr. Stefanie Weber

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Vergleich der Zilienschlagfrequenzen von gesunden Probanden bei verschiedenen
Untersuchungstemperaturen und Etablierung von Normwerten**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg, vorgelegt von

Jana Maria Hahn aus Bensberg
Marburg 2021

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
15.09.2021

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekanin:	Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner
Referent:	Priv. Doz. Dr. med. Wilfried Nikolaizik
Korreferent:	Prof. Dr. Dominik Oliver

Für meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Primäre Ciliäre Dyskinesie	1
1.1.1 Physiologie der Zilien	1
1.1.2 Pathophysiologie der Primären Ciliären Dyskinesie	5
1.1.3 Phänotyp der Primären Ciliären Dyskinesie	7
1.1.3.1 Respiratorische Symptome	8
1.1.3.2 Situs inversus	9
1.1.3.3 Hydrocephalus internus	10
1.1.3.4 Symptome des Auges	11
1.1.3.5 Otitis media	12
1.1.3.6 Symptome der Reproduktionsorgane	12
1.1.4 Diagnostik der Primären Ciliären Dyskinesie	12
1.1.4.1 PCD-typische Anamnese	13
1.1.4.2 Nasales NO-Screening	14
1.1.4.3 High-Speed-Videoanalyse	15
1.1.4.4 Weiterführende Mikroskopie	17
1.1.4.5 Genetische Analyse	19
1.1.5 Therapie der Primären Ciliären Dyskinesie	21
1.2 Fragestellung	22
2 Material und Methoden	24
2.1 Kriterien zur Auswahl des Probandenkollektivs	24
2.2 Datenerfassung	24
2.2.1 Vorbereitung	24
2.2.2 Personendaten	25

2.2.3	Nasentemperatur	25
2.2.4	Zilienschlagfrequenz	25
2.3	Statistische Auswertung	28
2.4	Ethikvotum	28
2.5	Literaturrecherche	28
3	Ergebnisse	29
3.1	Demographische Daten	29
3.1.1	Ausschlusskriterien	29
3.1.2	Probandenkollektiv	29
3.1.2.1	Untergruppen	29
3.2	Messergebnisse	30
3.2.1	Ziliäre Schlagfrequenz	30
3.2.1.1	CBF in Abhängigkeit von der Temperatur	30
3.2.1.2	Normwerterhebung	33
3.2.1.3	CBF in Abhängigkeit der Zeit ex vivo	33
3.2.1.4	CBF in Abhängigkeit vom Alter	38
3.2.2	Nasenschleimhaut-Temperatur	40
4	Diskussion	42
4.1	Probandenkollektiv	42
4.1.1	Anzahl	43
4.2	CBF bei 25 °C, 32 °C und 37 °C	43
4.2.1	CBF in Abhängigkeit von der Temperatur	46
4.2.2	CBF in Abhängigkeit von der Zeit ex vivo	47
4.3	CBF in Abhängigkeit vom Alter	48
4.4	Intranasale Temperatur	50
4.5	Methodenkritik	51
4.6	Schlussfolgerung	52
5	Zusammenfassung	54
6	Summary	56

7	Literaturverzeichnis	57
8	Anhang	70
9	Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen	74
10	Danksagung	76

Abkürzungsverzeichnis

ATP - Adenosintriphosphat

cAMP - Cyclisches Adenosinmonophosphat

CBF - Ciliary Beat Frequency

DRC - Dyneinarmregulatorkomplex

fps - frames per second

HSVA - High-Speed Videoanalyse

IDA - Inner Dynein Arm

IF - Immunfluoreszenz

Lrd - Left right dynein

MAP - Mikrotubuli-assoziiertes Protein

NO - Stickstoffmonoxid

ODA - Outer Dynein Arm

PCD - Primäre Ciliäre Dyskinesie

ROI - Region of Interest

RSV - Respiratorisches Synzytial-Virus

SCD - Sekundäre Ciliäre Dyskinesie

TEM - Transmissionselektronenmikroskopie

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Querschnitt auf verschiedenen Ebenen durch eine motile 9x2+2-Zilie (Knowles et al. 2013)	2
Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Horizontalschnitts einer Zilie; modifiziert nach (Cilia, flagella, and centrioles Celebrate Cytochemistry Gwen V. Childs, Ph. D.)	3
Abbildung 3: Effektiver Hinschwung (\rightarrow), Rückschwung (\leftarrow) und Flussrichtung (\leftrightarrow) (Satir 1974)	5
Abbildung 4: Darstellung der Zilienstruktur und deren Vorkommen im menschlichen Körper (Omran 2005)	8
Abbildung 5: Beispiele radiologischer Bildgebung von Lateralitätsdefekten. (A) Situs solitus mit normgerechter Anordnung der Organe. (B) Situs inversus totalis mit spiegelbildlicher Anordnung der Organe. (C) Situs ambiguus mit linksseitigem Herzschatten, rechtsseitiger Magenblase, rechtsseitiger Leber und intestinaler Malrotation. C = Herzspitze; L = Leber; M = intestinale Malrotation; S = Magen. (Shapiro et al. 2014)	10
Abbildung 6: Standardisierter Algorithmus zur PCD-Diagnostik (Nüßlein et al. 2013)	13
Abbildung 7: Lichtmikroskopische Darstellung zilienbesetzten Epithels. (a) Intakter Zellverband. (b) Zellverband mit hervorstehenden Einzelzellen. (c) Einzelzelle.	16
Abbildung 8: Immunfluoreszenz am Beispiel einer RSPH9-Mutation. Antikörper gegen acetyliertes Tubulin (grün) stellen Zilien dar. Antikörper gegen RSPH9 (rot) können genutzt werden, um verschiedene Defekte am Kopf der radialen Speichen zu identifizieren. Die physiologische Lokalisation der Zilienkomponenten wird durch deren Co-Lokalisation (gelb) repräsentiert. Zellkerne sind blau dargestellt; DIC: 'differential interference contrast microscopy'; Maßstabsbalken = 10 μ m. (Lucas et al. 2017)	18
Abbildung 9: Elektronenmikroskopische Befunde. (A) Normale ziliäre Ultrastruktur. (B) Defekte des äußeren und inneren Dynein-Arms. (C) Defekt des äußeren Dynein-Arms. (D) Defekt des inneren Dynein-Arms. (E) Defekt des inneren Dynein-Arms und Fehlanordnung der Mikrotubuli. Modifiziert nach Leigh et al. (2009) und Shapiro et al. (2016)	19
Abbildung 10: CBF bei 25 °C, 32 °C und 37 °C als Boxplot mit Median, 25%- und 75%-Perzentile [Hz]	31
Abbildung 11: CBF bei 25 °C \uparrow , 25 °C \downarrow , 32 °C \uparrow , 32 °C \downarrow , 37 °C \uparrow und 37 °C \downarrow als Boxplot mit Median, 25%- und 75%-Perzentile [Hz]	33
Abbildung 12: Zeit ex vivo bei 25 °C, 32 °C und 37 °C. Darstellung getrennt nach auf- bzw. absteigender Temperaturreihenfolge als Boxplot mit Median, 25%- und 75%-Perzentile [min]	35

Abbildung 13: CBF in Abhängigkeit der Zeit ex vivo bei 25 °C [Hz]	36
Abbildung 14: CBF in Abhängigkeit der Zeit ex vivo bei 32 °C [Hz]	37
Abbildung 15: CBF in Abhängigkeit der Zeit ex vivo bei 37 °C [Hz]	37
Abbildung 16: CBF in Abhängigkeit vom Alter bei 25 °C [Hz]	38
Abbildung 17: CBF in Abhängigkeit vom Alter bei 32 °C [Hz]	39
Abbildung 18: CBF in Abhängigkeit vom Alter bei 37 °C [Hz]	40
Abbildung 19: Nasenschleimhaut-Temperatur (NT) rechts, links und gesamt [°C]	41
Abbildung 20: Probandeninformation	70
Abbildung 21: Einverständniserklärung Probanden	71
Abbildung 22: Fragebogen Probanden	72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verteilung ultrastruktureller Zilien-Defekte bei PCD (Lucas et al. 2017)	7
Tabelle 2: Typische Manifestationen der PCD (Nüßlein et al. 2013)	14
Tabelle 3: Fragebogen Ausschlusskriterien	25
Tabelle 4: Darstellung der Temperaturfolge	26
Tabelle 5: CBF bei 25 °C, 32 °C und 37 °C [Hz]	31
Tabelle 6: CBF bei 25 °C↑, 25 °C↓, 32 °C↑, 32 °C↓, 37 °C↑ und 37 °C↓ [Hz]	32
Tabelle 7: Normwerte der CBF bei 25 °C, 32 °C und 37 °C [Hz]	33
Tabelle 8: Zeit ex vivo bei 25 °C, 32 °C und 37 °C [min]	34
Tabelle 9: Zeit ex vivo bei 25 °C, 32 °C und 37 °C. Darstellung getrennt nach auf- bzw. absteigender Temperaturreihenfolge [min]	34
Tabelle 10: Alter der Probanden [Jahre]	38
Tabelle 11: Nasenschleimhaut-Temperatur (NT) rechts, links und gesamt [°C]	40
Tabelle 12: Inhaltsangabe RPMI Medium 1640	73

1 Einleitung

1.1 Primäre Ciliäre Dyskinesie

Die Primäre Ciliäre Dyskinesie (PCD) ist eine seltene genetische Erkrankung, die verschiedene Defekte an den Zilien unterschiedlicher Epithelien und Organsysteme hervorruft (Thomas et al. 2009; Knowles et al. 2013). Im Vordergrund steht dabei eine Beeinträchtigung der mukoziliären Clearance der Lunge, die vor allem durch wiederkehrende Infektionen der Atemwege und deren Folgeerscheinungen zum Ausdruck kommt (O’Callaghan et al. 2007). Sie kann mit Hydrocephalus internus, Otitis media, Situs inversus oder männlicher Infertilität verbunden sein (Satir und Christensen 2007).

Die in der Literatur angegebene Prävalenz der PCD variiert stark von etwa 1:10 000 (Rubbo et al. 2019) über 1:20 000 (Gärtig und Konietzko 2006) bis hin zu 1:40 000 (Kuehni et al. 2010), wonach in Deutschland etwa 2000 bis 8000 Patienten betroffen sind. Die Diagnose wird allerdings wohl nur bei einem kleinen Anteil der Patienten gestellt. Daher ist anzunehmen, dass die Prävalenz deutlich höher liegen könnte (O’Callaghan et al. 2007).

Der PCD zugrunde liegen verschiedene Mutationen in unterschiedlichen Genen (Knowles et al. 2013). Diese haben zur Folge, dass sich das klinische und pathophysiologische Erscheinungsbild der Erkrankung vielfältig gestaltet, was wiederum eine schnelle und sichere Diagnose der PCD erschwert (Shah et al. 2016). In Langzeitstudien konnten eine eingeschränkte Lungenfunktion sowie ein erhöhter Anteil an Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa* bei Patienten mit später Erstdiagnose nachgewiesen werden (Martin et al. 2010). Daher ist eine zeitnahe Diagnosestellung von Bedeutung; diese ermöglicht die frühzeitige Einleitung einer Therapie, die essentiell ist, um eine gute Lungenfunktion und Lebensqualität so lange wie möglich zu erhalten (Barbato et al. 2009).

1.1.1 Physiologie der Zilien

Zilien (lat. *cilium*, ‚Wimper‘), auch Kinozilien oder Flimmerhärchen genannt, sind haarförmige Membran-Ausstülpungen an eukaryotischen Zellen. Der Zellfortsatz ist etwa 10 µm lang und beinhaltet das Axonem, ein Zytoskelettsystem aus Mikrotubuli, das von einem Basalkörperchen ausgeht. Dieses Basalkörperchen stellt das Organisationszent-

rum dar, von dem aus die Mikrotubuli entwickelt werden (Satir und Christensen 2007). Der Aufbau entspricht dabei dem sogenannten 9x3-Muster; demnach setzt sich das Zytoskelettsystem des Basalkörperchens aus neun kreisförmig angeordneten Mikrotubuli-Triplets (9 x 3) zusammen (vgl. Abbildung 1) (Horn et al. 2019).

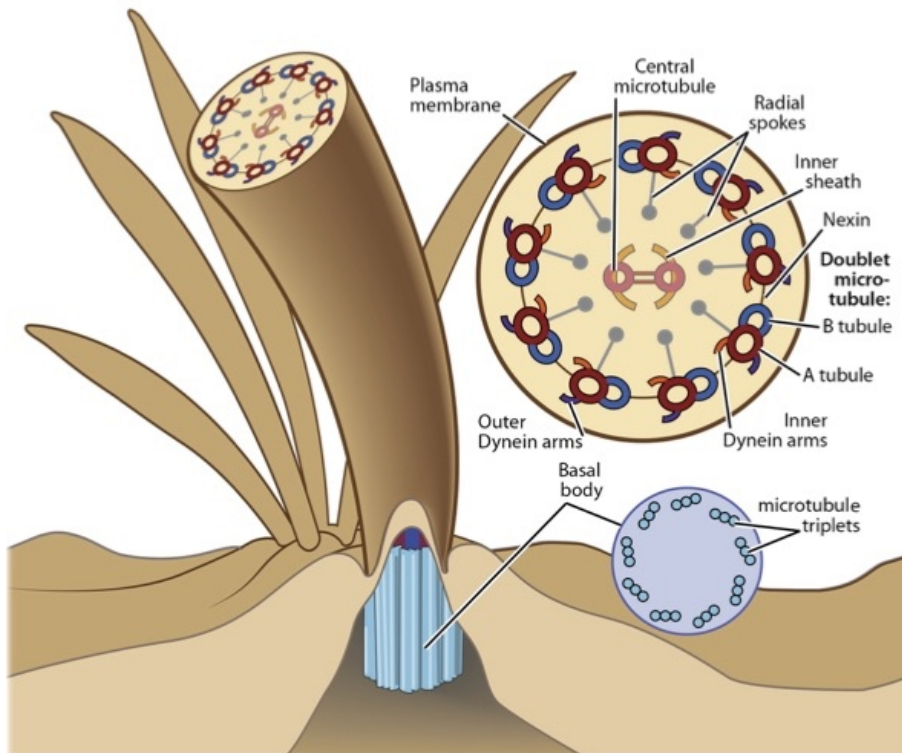


Abbildung 1: Querschnitt auf verschiedenen Ebenen durch eine motile 9x2+2-Zilie (Knowles et al. 2013)

Dagegen entspricht der physiologische Aufbau des Axonems und somit der eigentlichen Zilie einem 9x2+2-Muster. Hierbei sind neun periphere Mikrotubuluspaare (9 x 2) – bestehend aus einem A- und einem B-Tubulus – radiär um zwei einzelne (+ 2), zentrale Mikrotubuli, das sogenannte Zentralpaar, gruppiert (vgl. Abbildung 2) (Horn et al. 2019). Diese 9x2+2-, oder kurz 9+2-Zilien kommen im respiratorischen Epithel, aber auch im Reproduktionstrakt der Frau sowie entlang der Wände der Hirnventrikel vor. Ihre Aufgabe besteht im Transport von Schleim oder Flüssigkeiten (Satir und Christensen 2007). Fehler im Aufbau dieser 9+2-Struktur stellen in vielen Fällen die Ursache für eine PCD dar (Raidt et al. 2014).

Das etwa 150 µm lange Äquivalent zu den 9+2-Zilien sind die Flagellen (zu lat. *flagellum* ‚Geißel‘), die beispielsweise die Spermischwänze bilden und den Spermien als Fortbewegungsmittel dienen (Gärtig und Konietzko 2006; Horn et al. 2019).

Neben den motilen 9+2-Zilien gibt es noch eine weitere große Gruppe von Zilien, deren Axonemstruktur einem 9x2+0-Muster (kurz 9 + 0) entspricht. Diesen Zilien fehlt das Zentralpaar, weshalb sie meist keine Bewegungsfähigkeit besitzen. Sie kommen überwiegend auf spezialisierten Geweben wie den Nierentubuli, den Gallengängen, dem endokrinen Pankreas und der Schilddrüse vor. Zusätzlich sind sie jedoch auch auf Zellen wie Chondrozyten, Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Neuronen zu finden, wo sie häufig sensorische Funktionen ausüben (Satir und Christensen 2007).

Eine Ausnahme hiervon stellt eine bewegliche Form von Zilien mit 9+0-Muster dar, die auf dem Primitivknoten in der embryonalen Entwicklung vorkommt (Satir und Christensen 2007). Diese zeigen im Tiermodell eine rotierende Bewegung und spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Definierung der Rechts-Links-Achse des Körpers (Okada et al. 2005).

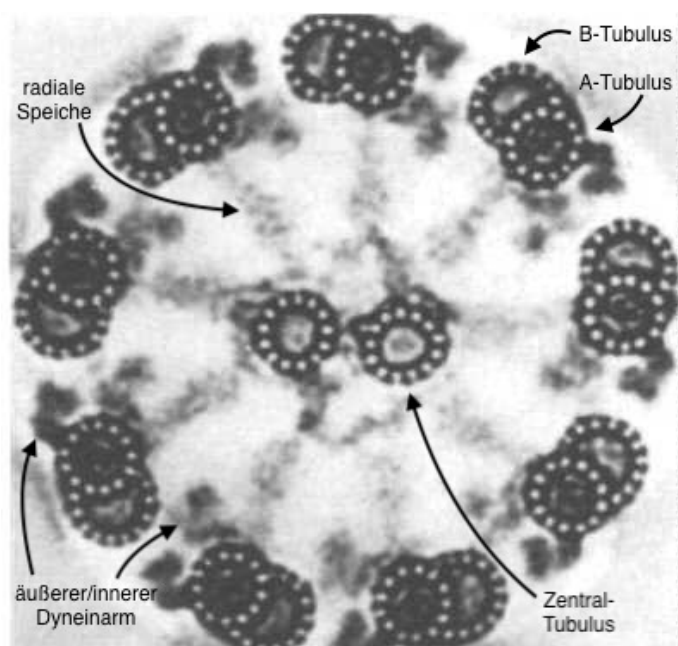


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Horizontalschnitts einer Zilie; modifiziert nach (Cilia, flagella, and centrioles | Celebrate Cytochemistry | Gwen V. Childs, Ph. D.)

Wie in Abbildung 1 dargestellt, sind die Mikrotubuli untereinander mehrfach durch verschiedene Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) verbunden (Horn et al. 2019; Childs). Die Verbindung der peripheren Mikrotubuluspaare erfolgt dabei über Nexinbrücken. An den A-Tubuli sind die radialen Speichen verankert, die mit dem Zentralpaar kommunizieren (Knowles et al. 2013).

Neben den Nexinbrücken und den radialen Speichen stellen die Dyneine weitere MAPs dar: Hierbei handelt es sich um Motorproteine, die jeweils an den A-Tubuli entspringen. Generell gibt es zwei Dynein-Arme, den äußeren (Outer Dynein Arm, ODA) und den inneren Dynein-Arm (Inner Dynein Arm, IDA) (Omran 2005). Diese verbinden den A-Tubulus eines Mikrotubuluspaares mit dem B-Tubulus des jeweils benachbarten Mikrotubuluspaares und können sich an diesem benachbarten B-Tubulus entlang bewegen. Die Schlüsselfunktion kommt dabei den schweren Ketten zu, die die ‚Köpfe‘ der Dyneine bilden. Eine Reaktion in ihrem sogenannten ‚P1-loop‘ bewirkt unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) eine Konformationsänderung. Dadurch verschieben sich die Mikrotubuluspaare gegeneinander (Satir und Christensen 2007). Die Gleitbewegung führt dann zu einer Krümmung der Zilie (Omran 2005; Linke und Pfister 2019).

Die Regulierung der Geschwindigkeit der Gleitbewegung erfolgt über die cAMP-abhängige Phosphorylierung und Dephosphorylierung der leichten Kette des ODA. Somit ist dieser für die Frequenz des Zilienschlags zuständig (Hamasaki et al. 1998). Dagegen ist der IDA für die Form des Zilienschlags verantwortlich, indem er das Ausmaß der Gleitbewegung an spezifischen Mikrotubuluspaaren steuert. Seine Regulierung erfolgt über die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen der radialen Speichen (Habermacher und Sale 1997).

Die beiden zentralen Mikrotubuli sind mit einem komplexen Apparat von Polypeptid-Anhängseln ausgestattet, die mit den Köpfen der radialen Speichen kommunizieren. Sie können die Gleitbewegung zwischen den Mikrotubuli lokal kontrollieren. Dabei kommt der Ausrichtung des Zentralpaars eine entscheidende Rolle zu, da durch sie die räumliche Ausrichtung des Zilienschlags definiert wird (Wargo und Smith 2003).

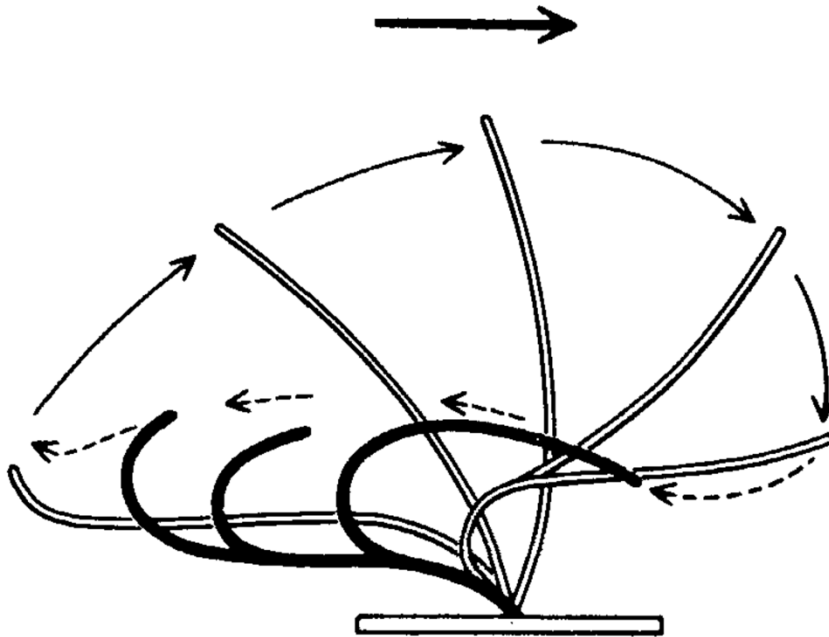


Abbildung 3: Effektiver Hinschwung (\rightarrow), Rückschwung (\leftarrow) und Flussrichtung (\rightarrow) (Satir 1974)

Die aus diesem komplexen Zusammenspiel resultierende Bewegung ist in Abbildung 3 dargestellt. Sie besteht aus einem effektiven Hinschwung (dem eigentlichen Zilienschlag), der die Flussrichtung der zu bewegenden Flüssigkeit bestimmt, sowie einem Rückschwung, der die Zilie in ihre Ursprungsposition zurückbringt. Dafür ist die Zilie effektiv in zwei funktionelle Hälften unterteilt, von denen die eine für den Hinschwung, die andere für den Rückschwung zuständig ist (Satir 1974; Afzelius 1999).

Die Zellen des Zilien-besetzten respiratorischen Epithels sind von einer dünnen Flüssigkeitsschicht umgeben, die sich unterhalb der Mucusschicht befindet. Während des effektiven Zilienschlags, wenn die Zilien gestreckt sind, ragen sie mit ihrem oberen Teil in die Mucusschicht und schieben diese so oralwärts. Während des Rückschwungs hingegen sind die Zilien gebogen und horizontal geneigt und bewegen sich so nur in der sie umgebenden Flüssigkeitsschicht unter der Mucusschicht in ihre Ausgangsposition (Sanderson et al. 1990).

1.1.2 Pathophysiologie der Primären Ciliären Dyskinesie

Bei einer PCD ist die mukoziliäre Clearance der Lunge beeinträchtigt (Davis et al. 2019). Als mukoziliäre Clearance oder Klärfunktion werden die Produktion und der Abtransport von Mucus und daran gebundenem Fremdmaterial wie Mikroorganismen

und Partikeln aus der Umwelt durch den koordinierten Schlag des Flimmerepithels bezeichnet (Sisson et al. 2003). Sie stellt ein zentrales Abwehrsystem des Bronchialtraktes dar und ist von zwei Faktoren abhängig: zum einen von der Sekretion von Mucus und zum anderen vom koordinierten Schlag der Zilien des respiratorischen Epithels (Van Der Baan et al. 1986).

Bei der PCD zeigen die Zilien häufig eine abnormale Motilität; konkret kann sich dies als Immotilität oder auch in Form eines langsamen oder unkoordinierten Schlagens äußern (Van Der Baan et al. 1986). Als ursächlich ist hierbei eine Reihe unterschiedlicher Gene zu betrachten, von denen die Mehrheit für Proteine kodiert, die an Struktur und Motilität der Zilien beteiligt sind. In den meisten Fällen zeigen sich somit ultrastrukturelle Abweichungen in den Zilien von Betroffenen, wobei auch eine physiologische Zilienstruktur vorkommen kann (Raidt et al. 2014). In diesen Fällen kann der PCD eine Mutation in einem der Gene zugrunde liegen, die für ziliäre Proteine kodieren, die wiederum den Zilienschlag beeinflussen, ohne jedoch zur Struktur des Axonems beizutragen (Satir und Christensen 2007).

Die Mehrheit der bislang identifizierten Gene kodiert für Komponenten der Dynein-Arme. Etwa 78 % der PCD-Fälle können auf einen Defekt der ODA und/oder der IDA zurückgeführt werden. In ca. 10 % geht ein Dynein-Arm-Defekt mit einer Fehlanordnung der Mikrotubuli einher. Schließlich ist in etwa 8 % der Fälle das Zentralpaar von einem Defekt betroffen (Lucas et al. 2017).

In Bezug auf die Dynein-Arm-Defekte sind vor allem die Gene DNAH5 (,dynein, axonemal, heavy chain 5‘) und DNAI1 (,dynein, axonemal, intermediate chain 1‘) zu nennen. So ist bei ca. 35 % der PCD-Patienten eines dieser Gene mutiert (Barbato et al. 2009). Als Folge dieser Mutationen fehlen die äußeren Dynein-Arme häufig vollständig oder diese sind nur verkürzt ausgebildet (DNAH5) bzw. schlagen sie gar nicht oder nur stark verlangsamt (DNAI1) (Kispert et al. 2003; Barbato et al. 2009).

Neueren Erkenntnissen zufolge ist auch das Gen CCDC39 häufig Locus PCD-verursachender Mutationen (Baz-Redón et al. 2020). Hierbei sind Defekte des IDA sowie eine Fehlanordnung der Mikrotubuli die Folge (Raidt et al. 2014).

Weitere mutierte Gene können strukturelle Veränderungen im zentralen Mikrotubulus-Paar verursachen (Castleman et al. 2009).

Neben den autosomal rezessiv vererbten PCD-Varianten konnte auch eine deutlich seltenere X-chromosomale Vererbung nachgewiesen werden (Budny et al. 2006). Die verschiedenen ultrastrukturellen Defekte und ihre Verteilung werden in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Verteilung ultrastruktureller Zilien-Defekte bei PCD (Lucas et al. 2017)

Ultrastruktureller Defekt	Verteilung
isolierter ODA-Defekt	44 %
Defekt von ODA und IDA	25 %
Defekt des IDA kombiniert mit Fehlanordnung der Mikrotubuli	10 %
isolierter IDA-Defekt	9 %
Defekt des Zentralpaars	8 %
andere*	1 %

* inclusive Zilienaplasie, Fehlausrichtung und zusätzlichen Mikrotubuli

1.1.3 Phänotyp der Primären Ciliären Dyskinesie

Aus den vielfältigen genetischen Ursachen ergibt sich ein heterogenes Erscheinungsbild der PCD (Gärtig und Konietzko 2006). Jedoch begründen sich alle Symptome auf dem Vorkommen (vgl. Abbildung 4) und dem Funktionsausfall der Zilien (Rubbo et al. 2019).

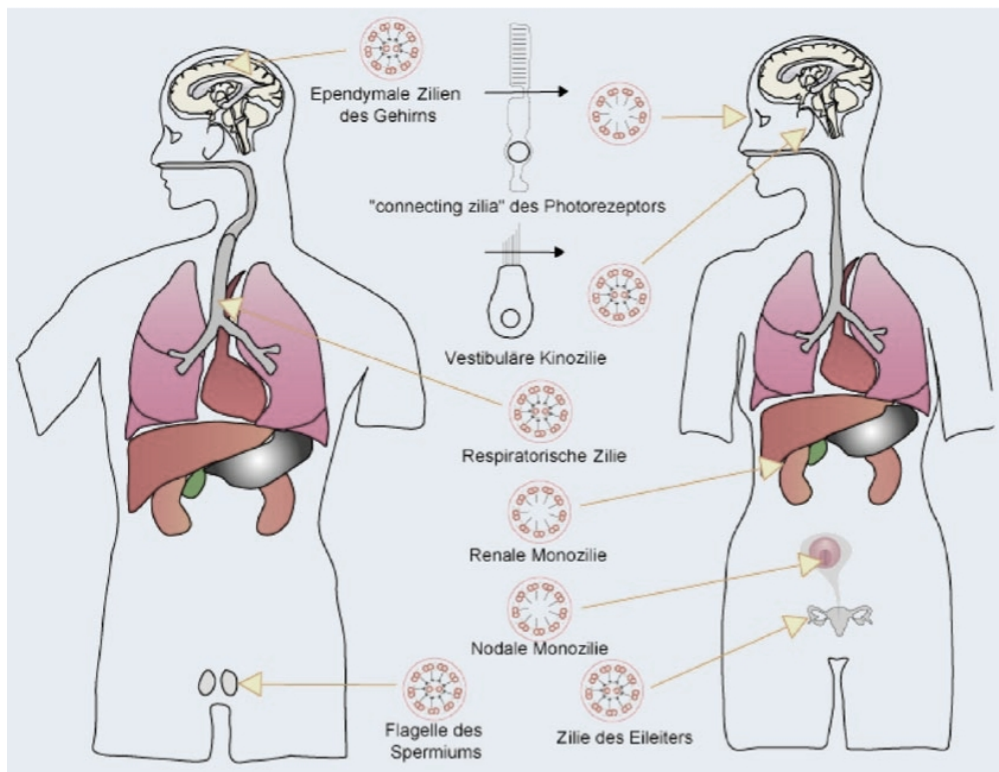


Abbildung 4: Darstellung der Zilienstruktur und deren Vorkommen im menschlichen Körper (Omran 2005)

1.1.3.1 Respiratorische Symptome

Das typischsten Merkmale der PCD sind rezidivierende Infektionen der Atemwege, chronische Rhinosinusitis und persistierender Husten (Barbato et al. 2009). Die gestörte mukoziliäre Clearance der Lunge hat zur Folge, dass Schleim und somit auch Krankheitserreger im Respirationstrakt zurückbleiben und sekundär zu Infektionen führen (Gärtig und Konietzko 2006). Durch diese rezidivierenden Pneumonien kommt es in der Folge zu irreversiblen Bronchiektasien, die wiederum als Ausgangsherd für weitere Infektionen fungieren (Höben et al. 2018). Somit gilt es, eine Progredienz der Bronchiektasien mit progressiver Abnahme der Lungenfunktion zu verhindern (Gärtig und Konietzko 2006).

In der Neugeborenenperiode kann sich eine PCD bereits ab dem ersten Lebenstag durch eine kontinuierliche Rhinorrhoe bemerkbar machen. Auch ein Atemnotsyndrom oder idiopathische Pneumonien bei reifen Neugeborenen sind mögliche Anzeichen (Bush et al. 2007). Im Kindesalter deuten eine weiter anhaltende chronische Rhinosinusitis und obstruktive Atemwegserkrankungen oder Bronchiektasien auf eine PCD hin (Davis et al. 2015).

Die Gesamtheit dieser Symptome kann jedoch auch ohne das Vorliegen einer PCD typischerweise im Kindesalter vorkommen, weshalb andere Ursachen der Symptomatik bei der Diagnostik der PCD zunächst ausgeschlossen werden müssen (Bush et al. 2007).

1.1.3.2 Situs inversus

Der Primitivknoten ist der Ort, an dem in der embryonalen Entwicklung erstmals eine Körperasymmetrie festgelegt wird (McGrath et al. 2003). Auf den Zellen des Primitivknotens kommen primäre Zilien vor, die eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Definierung der Links-Rechts-Achse (LR-Achse) des Körpers spielen (Okada et al. 2005). Auf jeder zentralen Zelle des Primitivknotens befindet sich eine motile Zilie, die über das Motorprotein ‚Left right dynein‘ (Lrd) verfügt. Diese Zilie zeigt im Tiermodell eine im Uhrzeigersinn gerichtete, rotierende Bewegung, die einen Strom („Nodal Flow“) der extraembryonalen Flüssigkeit von der späteren Körperachse aus gesehen nach links verursacht. Die peripher auf dem Primitivknoten vorkommenden sensorischen Zilien besitzen kein Lrd; dagegen detektieren sie wahrscheinlich den Nodal Flow und lösen daraufhin eine asymmetrische Genexpression von Transkriptionsfaktoren aus (McGrath et al. 2003).

Fällt beispielsweise durch eine Mutation im Lrd-Gen die Kontrolle über die Richtung der rotierenden Bewegung aus, wird der Nodal Flow einer zufälligen Verteilung entsprechend in der Hälfte der Fälle nach links und in der anderen Hälfte der Fälle nach rechts fließen (Noone et al. 1999). Ein Situs inversus totalis kommt bei der PCD also in etwa 50 % der Fälle vor und ist in Verbindung mit den oben beschriebenen respiratorischen Symptomen nahezu als ein Beweis für eine PCD zu betrachten (Kartagener 1933; Omran und Frischer 2013). Auch andere komplexe Lateralitätsdefekte (Heterotaxie) wie ein Situs ambiguus mit Asplenie, Polysplenie oder Herzvitien können eine Erkrankungsmanifestation darstellen (vgl. Abbildung 5) (Nüßlein et al. 2013; Shapiro et al. 2014).

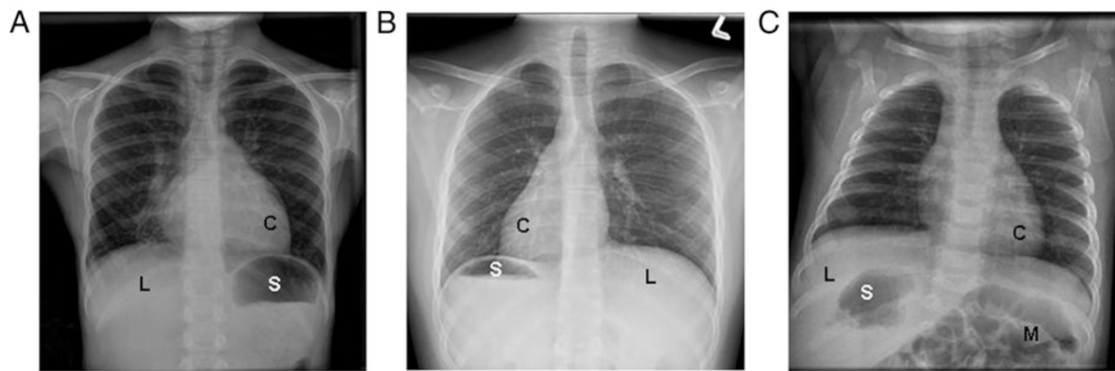


Abbildung 5: Beispiele radiologischer Bildgebung von Lateralitätsdefekten. (A) Situs solitus mit normgerechter Anordnung der Organe. (B) Situs inversus totalis mit spiegelbildlicher Anordnung der Organe. (C) Situs ambiguus mit linksseitigem Herzschatten, rechtsseitiger Magenblase, rechtsseitiger Leber und intestinaler Malrotation. C = Herzspitze; L = Leber; M = intestinale Malrotation; S = Magen. (Shapiro et al. 2014)

Die Symptom-Trias aus Bronchiektasie, Sinusitis und Situs inversus wurde nach ihrem Erstbeschreiber bereits 1933 als Kartagener-Syndrom bezeichnet (Kartagener 1933). Heute wird mit diesem Begriff dagegen auf das Vorliegen eines Situs inversus bei zugrundeliegender PCD Bezug genommen, ein Phänomen, das etwa 50 % der PCD-Patienten betrifft. Somit ist das Kartagener-Syndrom als eine spezifische Form der PCD zu betrachten (Omran und Frischer 2013).

1.1.3.3 Hydrocephalus internus

Die Ventrikel des Gehirns sind mit einem Ependym ausgekleidet, das motile Zilien trägt. Diese sind hier für den Fluss des Liquors durch das Ventrikelsystem zuständig (Ibañez-Tallon et al. 2004; Omran 2005). Der Liquor fließt von den Seitenventrikeln in den dritten Ventrikel und durch den *Aquaeductus mesencephali* in den vierten Ventrikel, von wo aus er in das äußere Liquorsystem (Spinalkanal und Subarachnoidalraum) abfließt. Dort wird der Liquor in das Blut- und Lymphsystem rückresorbiert (Weller et al. 1992).

Durch den koordinierten Schlag der ependymalen Zilien wird eine laminare und gerichtete Strömung im Aquaeductus cerebri erzeugt, die analog zum Nodal Flow Ependymal Flow genannt wird. Dieser Ependymal Flow ist während der Hirnentwicklung von essentieller Bedeutung für die Durchgängigkeit des Aquädukts. Die Funktionseinschränkungen der ependymalen Zilien haben eine Störung des regelrechten Liquorabflusses zur Folge. Folglich erhöht sich der Liquordruck in den vorgelagerten Ventrikeln, was

seinerseits zu einer Erweiterung der proximalen drei Ventrikel (zwei Seitenventrikel und dritter Ventrikel) führen kann (Ibañez-Tallon et al. 2004). Laut Ibañez-Tallon et al. ist davon auszugehen, dass es durch die triventrikuläre Ventrikelerweiterung zu einer Elongation und durch diese zu einer Konstriktion des Aquädukts kommt, die somit sekundär zu einem Verschluss desselben führt. Im Maus-Modell geschieht dies jedoch erst in der Zeit kurz vor und kurz nach der Entbindung, was die pränatal allenfalls leichte Ventrikelerweiterung erklären könnte (Wessels et al. 2003; Ibañez-Tallon et al. 2004).

Die Inzidenz des Hydrozephalus durch Aquädukt-Stenose bei PCD-Patienten liegt erhöht bei etwa 1:40, während eine allgemeine Inzidenz von etwa 3:10 000 anzusetzen ist (Ibañez-Tallon et al. 2004).

Auch die bei PCD-Patienten zu beobachtenden chronischen Kopfschmerzen könnten mit einem pathologischen Liquorfluss in Zusammenhang stehen (Afzelius und Mossberg 1995).

1.1.3.4 Symptome des Auges

Am Auge kommen Zilien unter anderem auf der Netzhaut vor. Hier stellen immotile 9+0-Zilien die Verbindung zwischen dem äußeren und dem inneren Segment der Photorezeptor-Zellen her (Besharse und Horst 1990). Ihre Aufgabe besteht darin, den Transport großer Proteinkomplexe zu gewährleisten und dadurch den Aufbau, den Umbau und den Erhalt des äußeren Photorezeptor-Segments zu unterstützen (Rosenbaum et al. 1999).

Sind bei einer PCD auch diese ‚Connecting-Cilia‘ von einem Funktionsverlust betroffen, kann die Erkrankung mit einer Degeneration der Photorezeptor-Zellen (Retinitis pigmentosa) einhergehen (Omran 2005).

Neben den Connecting-Cilia sind Zilien auch auf der Innenseite der Cornea vertreten, wo sie wahrscheinlich durch sensorische Funktionen deren Integrität sichern. Bei Vorliegen einer PCD kommt es hier vermehrt zu einem Keratokonus und anderen Formveränderungen der Hornhaut (Svedbergh et al. 1981).

1.1.3.5 Otitis media

Bei Kindern mit PCD sind ausgeprägte rezidivierende Otitiden mit Otorrhö typisch; konkret kommen diese in 60 bis 90 % der Fälle vor (Coren et al. 2002; Noone et al. 2004). Otitiden können mit einer Hörminderung und sogar mit Sprachentwicklungsverzögerungen einhergehen, bilden sich aber bis zum zwölften Lebensjahr spontan zurück (Majithia et al. 2005). Nicht selten wurden Kinder bereits vor einer PCD-Diagnose mit Paukenröhrchen versorgt, da die Erkrankung häufig mit rezidivierender Otitis media und chronischem Seromukotympanon verbunden ist (Omran und Frischer 2013).

1.1.3.6 Symptome der Reproduktionsorgane

Infertilität aufgrund von fehlender Spermienmotilität und dysmotiler Zilien in den Ductuli efferentes kommt bei etwa 50 % der männlichen Patienten vor. Bei Patientinnen sind Fertilitätseinschränkungen dagegen weniger häufig zu beobachten; hier sind sie vor allem auf die dysmotilen Zilien in den Tubae uterinae und den dadurch erschwerten Transport der Oozyte in den Uterus zurückzuführen (Afzelius und Eliasson 1983; Munro et al. 1994). So lässt sich auch eine erhöhte Rate an Extrauteringraviditäten erklären (Gärtig und Konietzko 2006).

1.1.4 Diagnostik der Primären Ciliären Dyskinesie

Die Tatsache, dass die PCD keine spezifischen klinischen Symptome, sondern ein heterogenes Erscheinungsbild zeigt, hat zur Folge, dass sich die Diagnostik schwierig gestaltet und die Diagnose häufig erst spät gestellt wird (Coren et al. 2002). Dies ist auch dem Umstand geschuldet, dass einige der PCD-Symptome, wie Husten, Rhinitis oder Otitis media, bei Kindern auch ohne Vorliegen einer PCD häufig vorkommen (Bush et al. 2007).

Wie in Abbildung 6 dargestellt, müssen daher unterschiedliche Untersuchungsmethoden herangezogen werden, um sich einer Diagnose dieser funktionell definierten Erkrankung zu nähern (Nüßlein et al. 2013). Für die definitive Diagnose ist dann der Nachweis einer ziliären Funktionsstörung bzw. einer eindeutigen, biallelischen Mutation in einem PCD-verursachenden Gen entscheidend (Lucas et al. 2017).

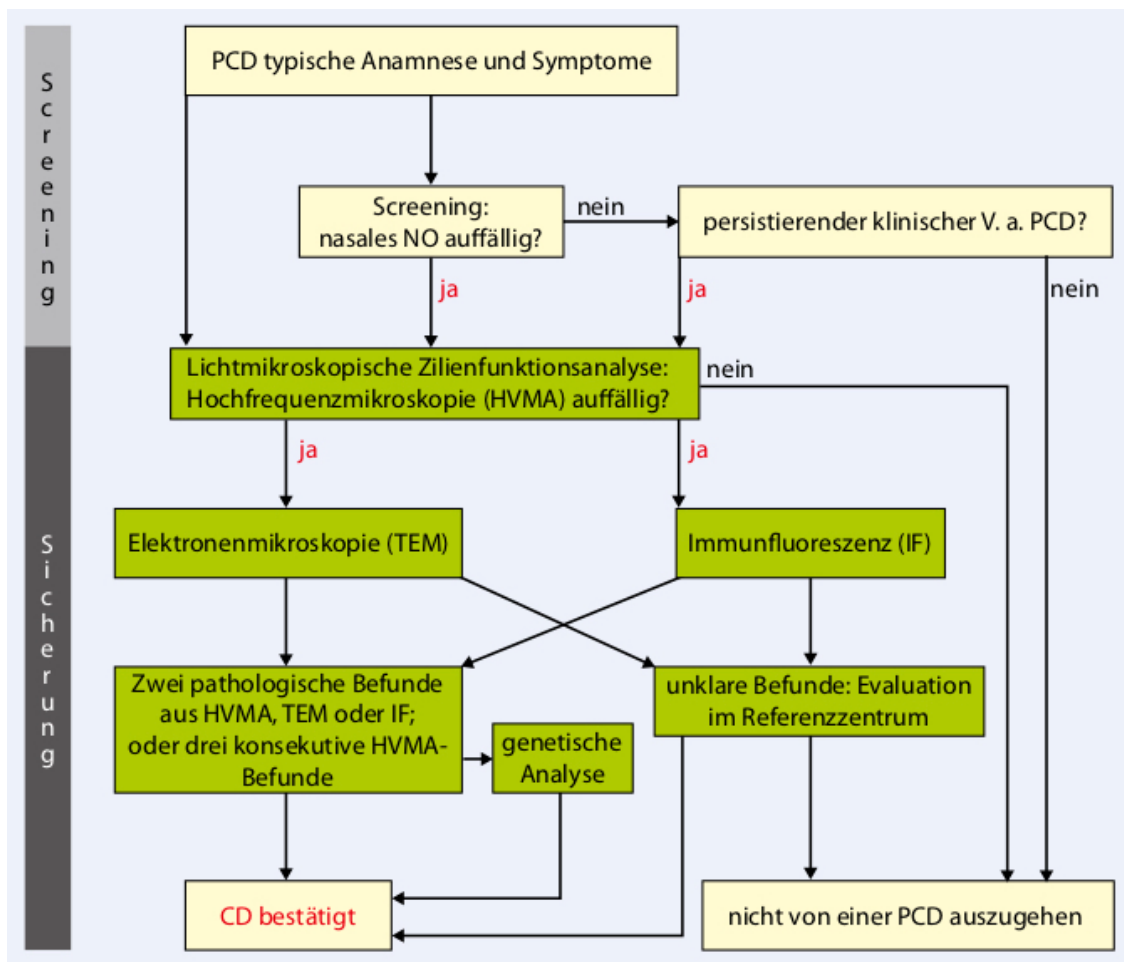


Abbildung 6: Standardisierter Algorithmus zur PCD-Diagnostik (Nüßlein et al. 2013)

1.1.4.1 PCD-typische Anamnese

Der erste Verdacht auf eine PCD sollte durch die typische Anamnese und den klinischen Eindruck geweckt werden. Dabei spielen die oben beschriebenen respiratorischen Symptome eine entscheidende Rolle (Nüßlein et al. 2013). In Tabelle 2 werden noch einmal sämtliche Symptome aufgeführt, die auf eine PCD hindeuten und somit die Einleitung einer entsprechenden Diagnostik fordern.

Tabelle 2: Typische Manifestationen der PCD (Nüßlein et al. 2013)

Altersgruppe	Manifestation	Absolute Indikation zur PCD- Diagnostik	Relative Indikation zur PCD- Diagnostik	Häufig bei PCD-Patienten	Selten bei PCD-Patienten
Alle	<i>Situs inversus (totalis oder partialis)</i>	×		×	
	<i>Heterotaxie (komplexe Lateraliitätsdefekte) mit/ohne Herzdefekte mit respiratorischer Symptomatik</i>	×		×	
	<i>Geschwister (v. a. mit respiratorischen Problemen) von PCD-Betroffenen</i>	×		×	
	<i>Ventrikulomegalie und Hydrozephalus aufgrund einer Aquäduktstenose</i>		×		×
	<i>Jungen mit orofaziale digitalem Syndrom Typ 1</i>	×			×
	<i>Ösophagus- und biliäre Atresie</i>		×		×
Säuglinge	<i>neonatales RDS, Atelektase beim reifen Neugeborenen</i>	×		×	
	<i>kontinuierliche Rhinorrhö beginnend am ersten Lebenstag</i>	×		×	
Kinder	<i>chronischer feuchter/produktiver Husten mit rezidivierenden Atelektasen (v. a. des Mittellappens) und Pneumonien ungeklärter Genese</i>	×		×	
	<i>Bronchiektasen ungeklärter Genese</i>	×		×	
	<i>atypisches therapierefraktäres Asthma (v. a. mit feuchtem Husten)</i>	×		×	
	<i>täglich bestehende therapierefraktäre Rhinitis</i>		×	×	
	<i>chronische Otitis media mit Ergüssen und Mittelohrschwerhörigkeit</i>		×	×	
	<i>schwere gastroösophageale Refluxerkrankung</i>		×	×	
	<i>chronische Sinusitis (ältere Kinder)</i>		×	×	
Jugendliche/ Erwachsene	<i>Retinitis pigmentosa (Jungen)</i>		×		×
	<i>polyzystische Nierenerkrankung</i>		×		×
	<i>progrediente Bronchiektasen (betont in Mittellappen/Lingula und Unterlappen)</i>	×		×	
	<i>chronische mukopurulente Sputumproduktion</i>	×		×	
	<i>Infertilität durch Spermiendysmotilität (v. a. bei gleichzeitig bestehenden respiratorischen Problemen)</i>	×		×	
	<i>progredienter Abfall der Lungenfunktion</i>		×	×	
	<i>Uhrglasnägel</i>		×	×	
	<i>Polyposis nasi</i>		×	×	
	<i>weibliche Infertilität und Extrauterin gravidität</i>		×		×

1.1.4.2 Nasaes NO-Screening

Mit einer Sensitivität von 93 % (Horvath 2003) bis 98 % (Leigh et al. 2013) und einer Spezifität von 95 % (Horvath 2003) bis 99,9 % (Leigh et al. 2013) bildet die Messung des nasalen Stickstoffmonoxids (NO) als nichtinvasive Screening-Methode einen ersten diagnostischen Wegweiser bei Verdacht auf PCD (Nüßlein et al. 2013). So ist die nasale NO-Konzentration bei Patienten mit PCD unabhängig von der Art des ultrastrukturellen Ziliendefektes statistisch signifikant niedriger als bei gesunden Menschen. Auch Patienten mit Erkrankungen der Atemwege wie Mukoviszidose oder idiopathischen Bronchiektasen, die mit ähnlichen Symptomen einhergehen, zeigen statistisch signifikant höhere nasale NO-Konzentrationen als Patienten mit PCD (Wodehouse et al. 2003).

Somit eignet sich diese Methode auch zur Abgrenzung der unterschiedlichen Differentialdiagnosen einer PCD (Horvath 2003).

Die Ursache für die verringerte nasale NO-Produktion konnte bislang nicht vollständig geklärt werden (Walker et al. 2012). Hypothesen zufolge könnte dieses Phänomen jedoch auf eine verminderte Biosynthese des NO zurückzuführen sein (Narang et al. 2002; Grasemann et al. 2005).

Die Messung der nasalen NO-Konzentration wird durchgeführt, während der Patient den Atem anhält oder gegen einen Widerstand ausatmet. Beide Methoden führen zu einem Verschluss des Gaumensegels (*Velum palatinum*) und dadurch zur funktionellen Trennung des sinunasalen Raums (Nasenhöhle und Nasennebenhöhlen) von den unteren Atemwegen. Hier beträgt die physiologische NO-Konzentration im Gegensatz zur Nase nur etwa 25 ppb. Bei guter Mitarbeit des Patienten kann das über etwa 20 sek stabile Plateau der nasalen NO-Konzentration erreicht werden, das für die Messung benötigt wird (Nüßlein et al. 2013). Verlässliche Ergebnisse lassen sich so bereits ab einem Patientenalter von fünf Jahren erreichen (Barbato et al. 2009). Bei jüngeren Patienten von zwei bis fünf Jahren kann das Atmen durch einen Widerstand wie einen Strohhalm in > 90 % der Fälle zu einem unwillkürlichen Schluss des Gaumensegels führen und so eine valide Messung ermöglichen (Jung et al. 2011).

Trotz der hohen Sensitivität und Spezifität reicht die alleinige Messung der nasalen NO-Konzentration für die Diagnose einer PCD nicht aus. Daher muss bei Auffälligkeiten im NO-Screening eine weiterreichende Diagnostik eingeleitet werden (Nüßlein et al. 2013).

1.1.4.3 High-Speed-Videoanalyse

Mittels einer High-Speed-Videoanalyse (HSVA) kann die Ziliarkinetik, also die Schlagfrequenz (,Ciliary Beat Frequency', CBF) und das Schlagmuster der Zilien, unmittelbar visualisiert und analysiert werden (Chilvers und O'Callaghan 2000). Sie wird als First-line-Untersuchung empfohlen und gilt als Goldstandard in der PCD-Diagnostik (Chilvers et al. 2003; Collins et al. 2014).

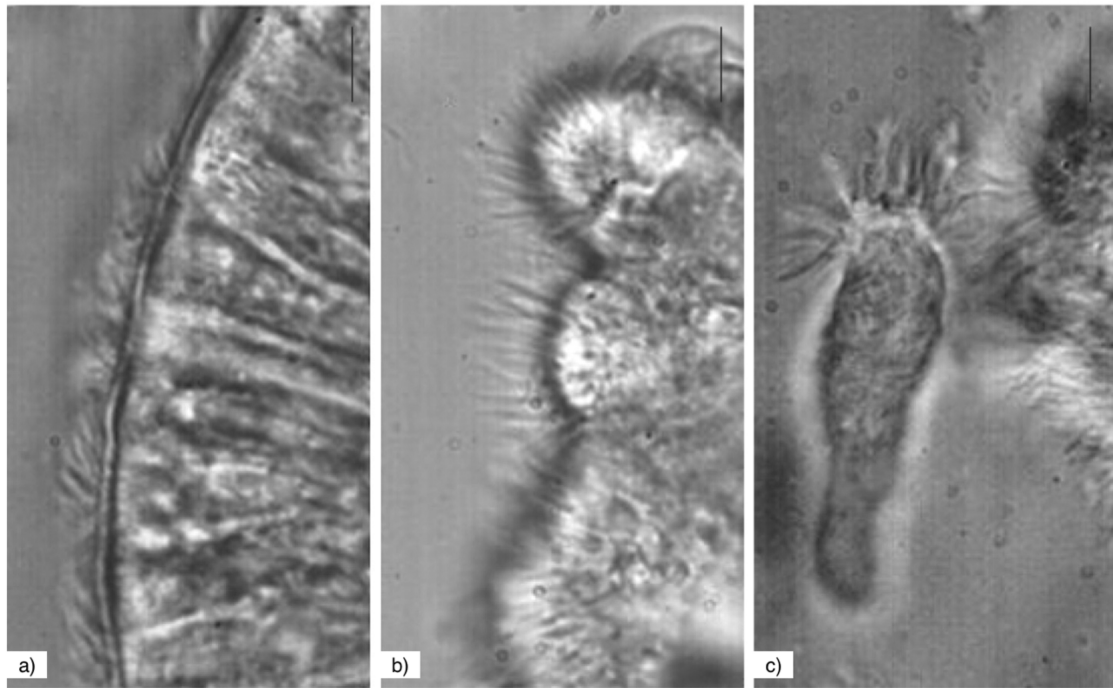


Abbildung 7: Lichtmikroskopische Darstellung zilienbesetzten Epithels. (a) Intakter Zellverband. (b) Zellverband mit hervorstehenden Einzelzellen. (c) Einzelzelle.
Maßstabsbalken = 55.5 μm . (Thomas et al. 2009)

Zur Untersuchung der Ziliarkinetik erfolgt eine mikroskopische Darstellung (vgl. Abbildung 7) von vitalen Zellen des respiratorischen Epithels, die meist durch eine nasale Bürstenbiopsie gewonnen werden (Lucas et al. 2017). In der HSVA sollten die CBF und das Schlagmuster prinzipiell kombiniert beurteilt werden, da die Messung der Frequenz allein keine adäquate Unterscheidung zwischen PCD- und Nicht-PCD-Patienten zulässt (Stannard et al. 2010).

Während das Schlagmuster der Zilien (vgl. Abbildung 3) bereits genau beschrieben ist (Chilvers und O’Callaghan 2000), liegen bezüglich der CBF unterschiedliche, wenig vergleichbare Ergebnisse vor. Dies ist vornehmlich auf den Umstand zurückzuführen, dass bislang ein standardisiertes Vorgehen bei der Durchführung der Messung fehlt. Von der Probenentnahme über die Aufbereitung der Zellen bis hin zu Temperatur und Messmethode finden sich unterschiedliche Herangehensweisen (Lucas et al. 2017).

Während einige Zentren die CBF bei einer Temperatur von 37 °C messen (O’Callaghan et al. 1991; Agius et al. 1998; Ho et al. 2001; Chilvers MA et al. 2003; Papon et al. 2012; Hirst et al. 2014; Jackson et al. 2016), greifen andere auf niedrigere Temperaturen wie 35 °C (Roth et al. 1991) oder 25 °C (Zhou et al. 2009; Sommer et al. 2010; Raidt et al. 2014; Davis et al. 2015) zurück. Auch bei der Vorgehensweise der eigentlichen Mes-

sung sind erhebliche Unterschiede festzustellen, die die Vergleichbarkeit der Ergebnisse beschränken. So wird die Geschwindigkeit der CBF in einigen Studien subjektiv in Kategorien eingeteilt (Van Der Baan et al. 1986; Noone et al. 2004); andere zählen die Schlagzyklen händisch aus und ermitteln daraus rechnerisch die CBF (Chilvers und O’Callaghan 2000; Jackson et al. 2016). Wieder andere nutzen das automatisierte Messverfahren des Computerprogramms SAVA („Sissons-Ammons video analysis“) (Sisson et al. 2003; Zhou et al. 2009; Raidt et al. 2014). Durch diese Vielfalt der genutzten Herangehensweisen kommt es zwangsläufig zu unterschiedlichen Ergebnissen, die schlecht miteinander zu vergleichen sind (Raidt et al. 2014).

1.1.4.4 Weiterführende Mikroskopie

Zusätzlich zur CBF und dem Schlagmuster der Zilien lässt die HSVA Rückschlüsse auf eventuelle strukturelle Veränderungen der Zilien zu; allerdings ist für eine nähere Beurteilung auf Immunfluoreszenz (IF) oder Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) zurückzugreifen. Hierbei gilt es jedoch zu beachten, dass ultrastrukturelle Veränderungen an den Zilien zwar typisch, jedoch nicht spezifisch für die PCD sind, da sie auch sekundär bei anderen Erkrankungen wie akuten Infektionen oder chronischer Bronchitis vorkommen können (Lucas et al. 2017).

Umgekehrt kann auch eine PCD vorliegen, ohne dass Auffälligkeiten über eine TEM oder IF nachgewiesen werden können. In diesem Fall kann die Diagnose durch drei separate auffällige HSVA-Analysen gestellt werden (Nüßlein et al. 2013).

Bestehen in der HSVA Auffälligkeiten, lässt sich das Ergebnis mittels IF verifizieren. Die gewonnene Probe wird im Zellmedium suspendiert, auf Objektträger aufgebracht, luftgetrocknet und fixiert (Nüßlein et al. 2013). Die Immunfluoreszenzfärbung der Proben erfolgt dann mit proteinspezifischen Antikörpern, die in der Fluoreszenzmikroskopie die Lokalisation der jeweiligen Proteine wiedergeben. Es steht eine Reihe von spezifischen Antikörpern gegen ziliäre Proteine zur Verfügung, darunter der ODA, der IDA, der Kopf der radialen Speichen und der Dyneinarmregulatorkomplex (DRC) (Lucas et al. 2017). Abbildung 8 veranschaulicht die IF am Beispiel einer RSPH9-Mutation.

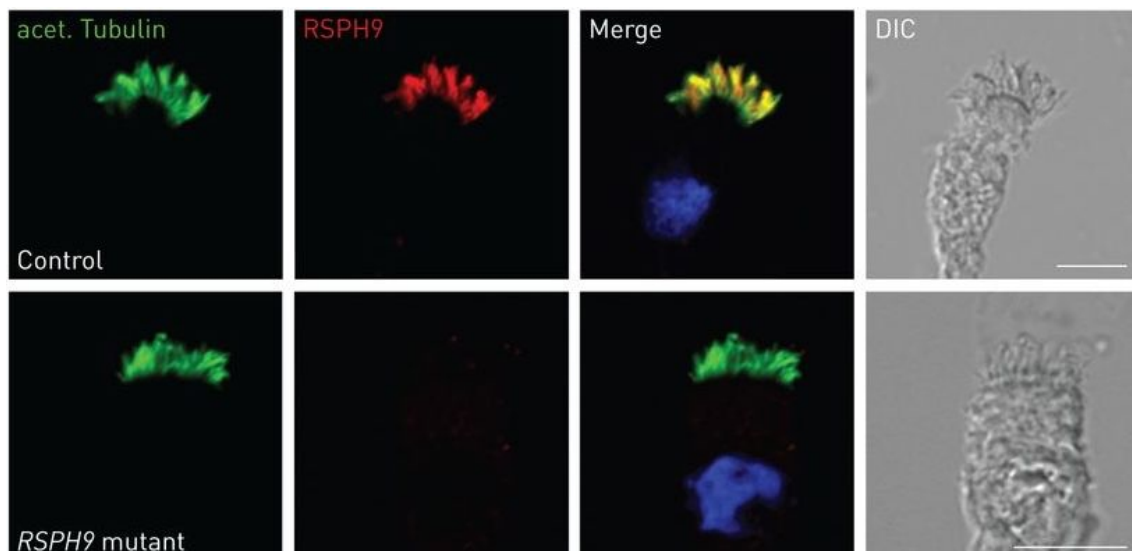


Abbildung 8: Immunfluoreszenz am Beispiel einer RSPH9-Mutation. Antikörper gegen acetyliertes Tubulin (grün) stellen Zilien dar. Antikörper gegen RSPH9 (rot) können genutzt werden, um verschiedene Defekte am Kopf der radialen Speichen zu identifizieren. Die physiologische Lokalisation der Zilienkomponenten wird durch deren Co-Lokalisation (gelb) repräsentiert. Zellkerne sind blau dargestellt; DIC: 'differential interference contrast microscopy'; Maßstabsbalken = 10 μm . (Lucas et al. 2017)

Die IF-Diagnostik hat in Verbindung mit der HSVA einen besonderen Stellenwert, da die auf diese Weise ermittelten Befunde Rückschlüsse auf die verursachenden Gene zulassen und so die Grundlage für eine gezielte genetische Diagnostik bieten (Nüßlein et al. 2013).

Eine Methode zum Nachweis von strukturellen Veränderungen, die ergänzend zur IF eingesetzt wird, ist die TEM. Dazu wird die für die HSVA gewonnene Probe in einer TEM-geeigneten Lösung fixiert und für die elektronenmikroskopischen Schnitte (vgl. Abbildung 9) aufbereitet (Leigh et al. 2009; Nüßlein et al. 2013). So können PCD-verursachende ultrastrukturelle Veränderungen dargestellt und nachgewiesen werden (Scholey 2008).

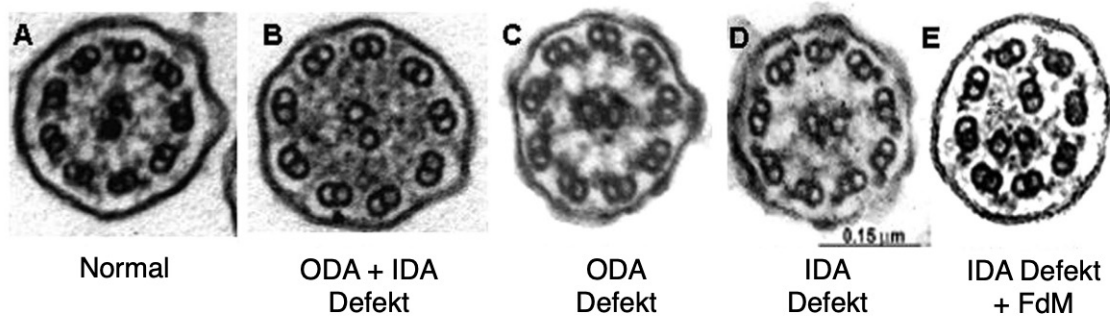


Abbildung 9: Elektronenmikroskopische Befunde. (A) Normale ziliäre Ultrastruktur. (B) Defekte des äußeren und inneren Dynein-Arms. (C) Defekt des äußeren Dynein-Arms. (D) Defekt des inneren Dynein-Arms. (E) Defekt des inneren Dynein-Arms und Fehlanordnung der Mikrotubuli. Modifiziert nach Leigh et al. (2009) und Shapiro et al. (2016)

Die Möglichkeiten der TEM zur Darstellung ultrastruktureller Veränderungen in den Zilien sind allerdings limitiert. So wurden bereits mehrere PCD-Typen ermittelt, die keine durch TEM detektierbaren ultrastrukturellen Veränderungen zeigen. Hierzu gehört beispielsweise die KTU-Mutation, die lediglich zu im Zilienschaft regional begrenzten Strukturveränderungen führt und so je nach zufälliger Schnittführung bei der TEM leicht unentdeckt bleiben kann (Omran et al. 2008).

Auch die Nexinbrücken können in der TEM nicht ohne Weiteres dargestellt werden. Dies hat zur Folge, dass Mutationen wie die des Gens *CCDC164*, die den DRC betreffen, leicht übersehen werden können (Wirschell et al. 2013).

Aufgrund ihrer geringen Elektronendichte stellen IDA-Defekte eine weitere Limitation der TEM dar (Papon et al. 2010).

1.1.4.5 Genetische Analyse

Bislang wurden 44 Gene identifiziert, die durch Mutationen eine PCD verursachen können und mit einer unterschiedlichen Zilien-Struktur einhergehen (Baz-Redón et al. 2020). Während die Mehrheit dieser Mutationen autosomal rezessiv vererbt wird, besteht auch die Möglichkeit einer X-chromosomalen Vererbung (Raidt et al. 2014).

Die am häufigsten von Mutationen betroffenen Gene kodieren für Strukturproteine der Dyneinarme. Dabei betreffen die folgenden Mutationen ausschließlich den ODA: *DNAH5* (Olbrich et al. 2002), *DNAH11* (Schwabe et al. 2008), *DNAI1* (Pennarun et al. 1999), *DNAI2* (Loges et al. 2008), *NME8* (*TXNDC3*) (Duriez et al. 2007), *DNAL1*

(Mazor et al. 2011), CCDC151 (Hjeij et al. 2014), CCDC114 (Onoufriadis et al. 2013) und ARMC4 (Onoufriadis et al. 2014).

Dagegen werden bei den folgenden Mutationen sowohl der ODA als auch der IDA strukturell verändert: CCDC103 (Panizzi et al. 2012), DYX1C1 (DNAAF4) (Tarkar et al. 2013), SPAG1 (Knowles MR et al. 2013), LRRC6 (Horani et al. 2013b), DNAAF2 (KTU) (Omran et al. 2008), DNAAF1 (LRRC50) (Duquesnoy et al. 2009; Loges et al. 2009), C21orf59 (Austin-Tse et al. 2013), DNAAF3 (Mitchison et al. 2012), ZMYND10 (Zariwala et al. 2013) und DNAAF5 (HEATR2) (Horani et al. 2012).

Währenddessen kommt es durch Mutationen in den Genen HYDIN (Olbrich et al. 2012), RSPH1 (Kott et al. 2013), RSPH3 (Jeanson et al. 2015), RSPH9 und RSPH4A (Frommer et al. 2015) zu Transpositionsdefekten, fehlenden radialen Speichen und/oder Defekten im zentralen Mikrotubuluspaar.

Weiterhin resultieren die Mutationen DRC1 (CCDC164) (Wirschell et al. 2013), GAS8 (DRC4) (Olbrich et al. 2015) und CCDC65 (DRC2) (Horani et al. 2013a) in Organisations- bzw. Ausrichtungsfehlern der Mikrotubuli und in einigen Fällen zusätzlich in fehlenden DRCs.

Die Kombination von Mikrotubuli-Organisationsfehlern und IDA-Defekten wird von Mutationen in den Genen CCDC39 (Merveille et al. 2011) und CCDC40 (Becker-Heck et al. 2011) ausgelöst.

Bei erwachsenen Patienten mit einer X-chromosomal vererbten RPGR-Mutation (Moore et al. 2006), bei denen in der TEM nicht immer eindeutige Befunde erhoben werden können, wird typischerweise eine Retinitis pigmentosa diagnostiziert, während eine weitere X-chromosomal vererbte Mutation (OFD1) (Budny et al. 2006) mit dem oral-fazial-digitalen Syndrom Typ 1 (einhergehend mit Fehlbildungen von Mundhöhle, Gesicht und Zehen/Fingern) verbunden ist (Ferrante et al. 2001).

Neben strukturellen Defekten der Zilien kann eine PCD allerdings auch bereits durch eine reduzierte Zahl von Zilien – wie bei den Genen CCNO (Wallmeier et al. 2014) und MCIDAS (Boon et al. 2014) – verursacht werden.

Die genetische Analyse kann nach der Untersuchung mittels HSVA, TEM und IF als weitere Maßnahme zur tiefergreifenden Beurteilung der Diagnose eingesetzt werden; allerdings wird ihr Einsatz nicht als Teil der initialen Diagnostik empfohlen (Barbato et al. 2009). Bei der künftigen genetischen Untersuchung von PCD-Patienten werden höchstwahrscheinlich weitere, bislang unbekannte PCD verursachende Gene und Mutationen identifiziert werden (Ferkol et al. 2006; Lucas et al. 2017).

1.1.5 Therapie der Primären Ciliären Dyskinesie

Für die PCD gibt es bislang keine spezifische Therapie. Da es an großen, randomisierten Studien zur Therapie der PCD fehlt, beruhen die bisherigen Ansätze auf Erfahrungswerten und Empfehlungen erfahrener Mediziner (Shapiro et al. 2016). Dabei soll mittels einer frühzeitigen Diagnose wie auch einer konsequenten Behandlung von Komplikationen die normale Lungenfunktion so lange wie möglich aufrechterhalten oder wiederhergestellt werden (Barbato et al. 2009).

Da bei der PCD die beeinträchtigte Clearance der Lunge im Vordergrund steht, wird eine physiotherapeutische Sekret-Förderung empfohlen (Gremmo und Guenza 1999; Shapiro et al. 2016). Auch die Sekret-Förderung durch Husten unterstützt die Reinigung der Atemwege. Ein weiteres Hilfsmittel, das hierbei herangezogen werden kann, bildet die Inhalation von Kochsalzlösungen und Mukolytika (Möller et al. 2006). Zusätzlich steht eine schlechte Belastungsfähigkeit in Zusammenhang mit einer verminderten Lungenfunktion bei PCD-Patienten. Daher ist auch ein tägliches kardiovaskuläres Training empfehlenswert (Madsen et al. 2013).

Ein weiterer Ansatz besteht darin, durch eine frühzeitige antibiotische Therapie von Atemwegsinfektionen eine progressive Lungendestruktion zu verhindern und so die Bildung von Bronchiektasien zu unterbinden (Gärtig und Konietzko 2006). Allgemein sind bei PCD-Patienten regelmäßig Infektionen mit *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae* zu verzeichnen. Ebenso kommen vermehrt *Pseudomonas-aeruginosa*-Infektionen und andere nichttuberkulöse Mycobakterien vor (Noone et al. 2004). Bei den ersten Anzeichen einer Infektion oder einer Verschlechterung der respiratorischen Situation sollte eine hoch dosierte, orale antibiotische Therapie eingeleitet werden, wenn möglich auf Basis eines Antibiotogramms. Vor allem bei *Pseudomonas-aeruginosa*-Infektionen sollte bei ausbleibendem Therapieerfolg ein zusätzlicher intravenöser Therapieversuch erfolgen (Gärtig und Konietzko 2006; Barbato et al. 2009).

Obwohl es bislang keine Belege für die Sinnhaftigkeit einer prophylaktischen antibiotischen Therapie gibt, wird diese in einigen Zentren praktiziert. Sie sollte in individuellen

Fällen vor allem dann in Erwägung gezogen werden, wenn ein regelmäßiger Einsatz von Antibiotika erforderlich ist (Barbato et al. 2009). Unterstützend werden symptomatische Therapien wie Bronchiodilatoren (β -Adrenergika) oder auch mechanische Verfahren wie die Nasendusche mit Emser Salz eingesetzt (Gärtig und Konietzko 2006; Omran und Frischer 2013).

Als präventive Maßnahme sollten Kinder bis zum Erreichen des Erwachsenenalters regelmäßig an Testungen der Lungenfunktion und des Hörvermögens teilnehmen. Falls nötig, sollten im Falle eines Hörverlustes Hörhilfen wie auch Sprachtherapie zum Einsatz kommen (Gärtig und Konietzko 2006; Bush et al. 2007). Weiterhin ist die Durchführung aller empfohlenen Impfungen inklusive Pneumokokken- und Influenza-Immunisierung und ggf. die Immunprophylaxe gegen das Respiratorische Synzytial-Virus (RSV) angeraten (Barbato et al. 2009; Shapiro et al. 2016).

1.2 Fragestellung

Bei der PCD-Diagnostik kommt der HSVA und somit der Messung der CBF eine wegweisende Rolle zu. Es handelt sich hierbei um die Untersuchungsmethode der Wahl bei Verdacht auf PCD. Die Durchführung einer HSVA stellt den Beginn der initialen Diagnostik dar (Nüßlein et al. 2013; Raidt et al. 2014).

Allerdings fehlt es bislang an einer ausreichenden quantitativen Datenbasis zur Etablierung verlässlicher Referenzwerte. Dies ist unter anderem auf den Umstand zurückzuführen, dass in den unterschiedlichen Zentren und Forschungseinrichtungen von verschiedenen Messverfahren Gebrauch gemacht wird sowie unterschiedliche Messbedingungen zugrunde gelegt werden (Lucas et al. 2017). Da die CBF jedoch maßgeblich von diesen Bedingungen – insbesondere der Temperatur – abhängt, konnten bislang keine Normwerte etabliert werden (Collins et al. 2014).

Angesichts dieser Ausgangslage empfiehlt die European Respiratory Society den einzelnen Zentren in ihrer 2017 publizierten Leitlinie zur Diagnostik der PCD die Erhebung eigener Normwerte, bis eine Standardisierung der Methodik erreicht sein wird (Lucas et al. 2017). Eine ähnliche Empfehlung wurde bereits zuvor von Chilvers und O’Callaghan (2000) sowie Raidt et al. (2014) ausgesprochen.

Vor diesem Hintergrund setzt es sich die vorliegende Arbeit zum Ziel, die Zilienschlagfrequenz gesunder Probanden bei verschiedenen Untersuchungstemperaturen zu vergleichen und entsprechende Normwerte abzuleiten. Dabei sollen die am häufigsten verwendeten Messtemperaturen zugrunde gelegt werden. Über eine nichtinvasive Methode soll die tatsächliche Temperatur in den Nasengängen gemessen werden, um auf diese Weise Rückschlüsse auf eine optimale Umgebungstemperatur für zukünftige Messungen zu ermöglichen. Zusätzlich soll die Altersabhängigkeit der Zilienschlagfrequenz überprüft werden. Hierbei ist hervorzuheben, dass im Rahmen der Studie aufgrund von Einschränkungen der Ethikkommission ausschließlich erwachsene Probanden und keine Kinder untersucht werden konnten.

Hieraus ergeben sich drei Fragestellungen:

1. Vergleich der Zilienschlagfrequenz bei gesunden Probanden und Normwerterhebung für die Untersuchungstemperaturen 25 °C, 32 °C und 37 °C
2. Bestimmung der intranasalen Temperatur als Empfehlung für zukünftige Messungen
3. Untersuchung der Altersabhängigkeit der Zilienschlagfrequenz bei gesunden Probanden

Dagegen ist es nicht das Ziel dieser Arbeit, das Messsystem SAVA zu beurteilen oder dieses mit anderen Systemen zu vergleichen.

2 Material und Methoden

2.1 Kriterien zur Auswahl des Probandenkollektivs

Aufgrund des Ethikvotums konnten keine Zellproben von minderjährigen Probanden gewonnen werden. Stattdessen wurden gesunde, erwachsene Studenten um die Teilnahme an der geplanten Studie gebeten. Alle Freiwilligen füllten einen Anamnese-Fragebogen aus. Dabei galten akute oder chronische Lungenerkrankungen, Allergien, Rauchen sowie die Einnahme von Medikamenten mit Wirkung auf die Lunge und die mukoziliäre Clearance als Ausschlusskriterien. Freiwillige, auf die keines dieser Ausschlusskriterien zutraf, wurden als lungengesund betrachtet und zur Teilnahme zugelassen. Bei Vorliegen eines auffälligen Untersuchungsergebnisses wurde den Teilnehmern eine Lungenfunktionstestung angeboten.

Die gesunden Probanden wurden mündlich sowie schriftlich über die Teilnahmebedingungen aufgeklärt und unterschrieben anschließend eine Einwilligungserklärung über ihre Teilnahme an der Studie. Der vollständige Fragebogen und die Einverständniserklärung sind dem Anhang zu entnehmen. Vor Beginn der Datenerhebung wurde zusätzlich die Zustimmung der Ethikkommission eingeholt. Die Deklaration von Helsinki wurde durchgängig befolgt.

2.2 Datenerfassung

Es wurden verschiedene Daten der Probanden erhoben: Daten zur Person und zu den Ausschlusskriterien, die Temperatur der Nase und die Zilienschlagfrequenz. Alle Daten wurden nach der Erhebung in eine Microsoft-Excel-Tabelle (www.microsoft.com) überführt.

2.2.1 Vorbereitung

Um die Schlagfrequenz der Zilien messen zu können, waren einige Vorbereitungen notwendig. So wurde für jeden Probanden ein Falcon™-Röhrchen mit 5 ml RPMI-1640-Medium benötigt. Diese wurden in größerer Zahl vorbereitet und bei -20 °C eingefroren. So konnte das Medium für jeden Probanden frisch aufgetaut werden.

2.2.2 Personendaten

Zur Erhebung der Personendaten füllten die Probanden zunächst einen kurzen Fragebogen aus. Dabei wurden Vor- und Nachname sowie das Geburts- und das Untersuchungsdatum erfasst, um daraus in der Folge das Alter der Probanden ableiten zu können. Zudem wurde den Probanden eine Liste mit Ausschlusskriterien zum Ankreuzen vorgelegt (siehe Tabelle 3). Der vollständige Fragebogen ist dem Anhang zu entnehmen.

Tabelle 3: Fragebogen Ausschlusskriterien

	Trifft zu	Trifft nicht zu
Leiden Sie an einer chronischen Lungenerkrankung?		
Leiden Sie an einer Allergie?		
Haben Sie zurzeit einen akuten Infekt?		
Rauchen Sie?		
Nehmen Sie regelmäßig Medikamente?		
Wenn ja, welche Medikamente?		

2.2.3 Nasentemperatur

Im nächsten Schritt wurde die Temperatur der Nase gemessen, um die optimale Temperatur für die Bestimmung der Zilienschlagfrequenz ermitteln zu können.

Dazu wurde mit einem berührungslosen Infrarot-Fieberthermometer (Geratherm non Contact, GT-101) aus einem Abstand von 4 bis 5 cm in beiden Nasenöffnungen jeweils zweimal die Temperatur gemessen.

2.2.4 Zilienschlagfrequenz

Die Messung der Zilienschlagfrequenz erfolgte bei drei verschiedenen Temperaturen: 25 °C, 32 °C und 37 °C.

Um möglichen Einflüssen der Steigerung oder Senkung der Temperatur auf die Schlagfrequenz im Verlauf der Messung entgegenzuwirken, wurde die Starttemperatur nach

dem Geburtsdatum der Probanden randomisiert. Dabei wurden die Proben von Probanden mit ungeradem Geburtsdatum zunächst bei 25 °C, dann bei 32 °C und zuletzt bei 37 °C gemessen, während die Messung der Proben von Probanden mit geradem Geburtsdatum umgekehrt erst bei 37 °C, dann bei 32 °C und schließlich bei 25 °C erfolgte (vgl. Tabelle 4).

Tabelle 4: Darstellung der Temperaturfolge

Geburtsdatum	Randomisierung	Temperatur	Temperatur	Temperatur
	Starttemperatur	1. Messung	2. Messung	3. Messung
ungerade	aufsteigend	25 °C	32 °C	37 °C
gerade	absteigend	37 °C	32 °C	25 °C

Diesem Prinzip entsprechend wurde ca. 30 min vor jeder Probenentnahme ein eingefrorenes Falcon™-Röhrchen mit RPMI-1640-Medium in einem Wasserbad aufgetaut und auf die jeweilige Starttemperatur (Temperatur der ersten Messung) gebracht. Bei einem Probanden mit ungeradem Geburtsdatum hatte das Medium also eine Temperatur von 25 °C, während die Temperatur bei einem Probanden mit geradem Geburtsdatum 37 °C betrug. Zusätzlich wurde der beheizbare Objektisch (H401-T-Controller; Okolab, Pozzuoli, Italien) am Mikroskop eingeschaltet und auf die dem Geburtsdatum des Probanden entsprechende Starttemperatur eingestellt. So konnte sichergestellt werden, dass die Proben über den gesamten Zeitraum der Messung korrekt temperiert waren.

Die Probenentnahme erfolgte ähnlich wie vom internationalen Referenzzentrum für PCD in Münster beschrieben (Omran 2018). So wurde der Proband zunächst darum gebeten, sich die Nase zu putzen, um auf diese Weise überschüssiges Sekret zu entfernen. Dabei standen das vorbereitete Falcon™-Röhrchen mit RPMI-1640-Medium in der benötigten Temperatur sowie eine Einweg-Abstrichbürste (Gynobrush[®]; Heinz Herenz, Hamburg, Deutschland) bereit, wobei Letztere kurz unter fließendem Wasser befeuchtet wurde. Zur Entnahme des Abstrichs wurde der Kopf des Probanden mit der linken Hand von hinten leicht fixiert, um daraufhin die Bürste mit der rechten Hand horizontal etwa 3 bis 4 cm in den unteren Nasengang (*Meatus nasi inferior*) einzuführen. Im nächsten Schritt wurde die Bürste zwei- bis dreimal um die eigene Achse gedreht, wieder zurückgezogen und in das RPMI-1640-Medium überführt. Hier wurde die Bürste mehrfach ausgeschüttelt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen im Medium zu erreichen.

Für die eigentliche Messung wurde dann mit der Bürste ein Ausstrich der Probe auf einen Objektträger (Marienfeld, Art.-Nr. 1000200) aufgebracht und dieser auf den vor-temperierten Objektisch des Mikroskops gelegt.

Zur Vorbereitung auf die nächsten Messungen wurde das Falcon™-Röhrchen mit der Probe bereits in das nächste Wasserbad mit 32 °C verbracht.

Zur Aufzeichnung der Messvideos wurde eine Basler-acA1300-200um-High-Speed-Video-Kamera (Basler AG, Ahrensburg, Deutschland) mit einem invertierten Phasenkontrastmikroskop (Nikon Eclipse Ts2R, CFI Super Plan Fluor ELWD ADM 40x C/0.60/3,6 Objektiv; Nikon GmbH Microscope Solutions, Düsseldorf, Deutschland) verbunden. Bei einer 400-fachen Vergrößerung (10 x 40) wurden nun mithilfe des Computerprogramms Sisson-Ammons Video Analysis (SAVA) (Sisson et al. 2003) Videos von mindestens fünf Zellen mit schlagenden Zilien angefertigt. Die Bildrate betrug dabei 120 fps (Frames per Second – Bilder pro Sekunde). Nach Anfertigung einer ausreichenden Anzahl von Videos wurde der beheizbare Objektisch auf die nächste Temperatur (32 °C) eingestellt. Sobald diese erreicht war, wurde der Vorgang bei 32 °C und dann je nach Starttemperatur bei 37 °C oder bei 25 °C wiederholt.

In der Zeit, in der die Temperatur hoch- bzw. herunterreguliert wurde, konnte die Schlagfrequenz der Zilien gemessen werden. Hierbei wurden ausschließlich unbeschädigte Zellen verwendet, die einen regelmäßigen Hin- und Rückschlag zeigten. Zellen, bei denen keine oder kaum Bewegung zu erkennen war oder die lediglich einzelne Zilien trugen, wurden von den Messungen ausgeschlossen.

Für jeden Probanden wurde die CBF an jeweils fünf Zilien-tragenden Zellen und zwei Punkten (Region of Interest, ROI) pro Zelle gemessen. Hierbei wurde zunächst der Mittelwert der beiden ROI jeder Zelle gebildet, um anschließend die CBF als Mittelwert der fünf Zellen zu berechnen. So wurden für jeden Probanden zehn Messungen in fünf Videos (entsprechend fünf Zilien-tragenden Zellen) durchgeführt.

Um verlässliche Ergebnisse zu erhalten, wurden die Ergebnisse nur übernommen, wenn eine Differenz der beiden ROI einer Zelle von 10 % und zusätzlich eine Differenz der Werte aller fünf Zellen von 20 % nicht überschritten wurde.

2.3 Statistische Auswertung

Die mittlere Schlagfrequenz (Mittelwert) jeder Zelle wurde mittels SAVA (Sisson et al. 2003) über die jeweils ausgewählten ROI berechnet.

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe von Microsoft Excel (Version 16.31 für Mac, Microsoft Corporation, Redmond Washington USA, www.microsoft.com) und GraphPad Prism (Version 6.0.7 für Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA, www.graphpad.com). Um Abweichungen von der Gaußschen Normalverteilung zu überprüfen, wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test genutzt. Im Falle von nicht normalverteilten Daten wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Test zum Vergleich der gepaarten Stichproben verwendet. Bei nicht gepaarten Stichproben wurde der Mann-Whitney-Test eingesetzt. Die Korrelationskoeffizienten wurden anhand der nichtparametrischen Spearman-Korrelation bestimmt. Die Perzentilen wurden mit der von Hyndman et al. (1996) beschriebenen Methode berechnet. Es wurden Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant erachtet.

2.4 Ethikvotum

Im Vorfeld der Datenerhebung wurde ein Ethikantrag bei der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin an der Philipps-Universität Marburg eingereicht. Zunächst wurde die Untersuchung der Zilienschlagfrequenz von Erwachsenen und Kindern beantragt, um die beiden Altersgruppen miteinander vergleichen und die Altersabhängigkeit der Zilienschlagfrequenz überprüfen zu können. Da dieser Antrag abgelehnt wurde, beschränkte sich der korrigierte Antrag auf 100 erwachsene Probanden. Dieser Antrag erhielt ein positives Ethikvotum.

Es bleibt also zunächst offen, ob sich die Zilienschlagfrequenz von Kindern von der von Erwachsenen unterscheidet.

2.5 Literaturrecherche

Die Literaturrecherche erfolgte überwiegend über PubMed und Google-Scholar.

3 Ergebnisse

In den folgenden Abschnitten sollen die im Rahmen der Studie erhobenen Ergebnisse dargestellt werden.

3.1 Demographische Daten

3.1.1 Ausschlusskriterien

Die Ausschlusskriterien wurden von allen Studienteilnehmern erfüllt. Keiner der 100 Probanden gab an, an einer Lungenerkrankung zu leiden. Auch ein akuter Infekt oder das Rauchen wurden von allen Probanden verneint. Lediglich ein Proband gab an, an einer Katzenhaarallergie zu leiden, jedoch ohne in der vorangegangenen Zeit mit Katzen in Kontakt gekommen zu sein. Ein weiterer Proband benannte eine Insektengiftallergie. Weiterhin gaben 70 % der Probanden an, keine Medikamente einzunehmen. Die von den restlichen 30 % der Probanden genannten Medikamente beinhalteten neben hormoneller Kontrazeption bei gut 19 % der Frauen L-Thyroxin, Modafinil, Amitriptylin und Ramipril sowie Rituximab. Keines dieser Medikamente hat einen Einfluss auf die CBF (Fachinformation Amitriptylin 2012; Fachinformation L-Thyroxin 2018; Fachinformation Modafinil 2019; Fachinformation Ramipril 2019; Fachinformation Rituximab 2020).

Demnach wurden die Ergebnisse aller 100 Probanden im Rahmen der Studie berücksichtigt.

3.1.2 Probandenkollektiv

Das beobachtete Probandenkollektiv umfasste 100 junge, gesunde Erwachsene; von diesen waren 26 männlich und 74 weiblich.

Das Alter der Probanden ist nicht normalverteilt (Kolmogorov-Smirnov-Test: $p = 0,005$). So besteht eine Spannweite von 20,2 bis 31,9 Jahren bei einem mittleren Alter (Median) von 23,5 Jahren.

3.1.2.1 Untergruppen

Alle Probanden wurden randomisiert nach ihrem Geburtsdatum einer der beiden Untergruppen zugeordnet.

Bei Probanden mit ungeradem Geburtsdatum wurden die Messungen in aufsteigender Temperatur-Reihenfolge durchgeführt, wobei mit 25 °C begonnen, mit 32 °C fortgeföhren und mit 37 °C geschlossen wurde. Zu dieser Gruppe gehörten 48 Probanden (35 Frauen und 13 Männer). Dagegen umfasste die Gruppe mit geradem Geburtsdatum 52 Probanden (39 Frauen und 13 Männer). In dieser Gruppe wurden die Messungen in absteigender Reihenfolge durchgeführt, sodass bei 37 °C begonnen wurde, um dann mit 32 °C fortzufahren und zuletzt zu 25 °C zu gelangen.

In Bezug auf das Alter sind keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festzustellen (Mann-Whitney-Test: $p = 0,454$):

aufsteigend – nicht normalverteilt (Kolmogorov-Smirnov-Test: $p = 0,001$), Median 23,4 Jahre (Spannweite 20,3–31,0 Jahre)

absteigend – nicht normalverteilt (Kolmogorov-Smirnov-Test: $p = 0,039$), Median 23,6 Jahre (Spannweite 20,3–31,9 Jahre)

3.2 Messergebnisse

3.2.1 Ziliäre Schlagfrequenz

Da die Messergebnisse der Studie nicht normalverteilt sind, erfolgt die Darstellung vor allem durch Angabe von Minimum, 25%-Perzentile, Median, 75%-Perzentile und Maximum. Zusätzlich werden der Mittelwert und die Standardabweichung angegeben.

3.2.1.1 CBF in Abhängigkeit von der Temperatur

Im Folgenden werden die erhobenen Daten zur ziliären Schlagfrequenz in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur dargestellt. Die mittlere CBF (Median) bei einer Umgebungstemperatur von 25 °C liegt bei 7,0 Hz mit einem Interquartilsabstand von 0,8 Hz. Bei einer Temperatur von 32 °C beträgt die mittlere CBF (Median) 7,6 Hz (Interquartilsabstand 0,6 Hz) und bei 37 °C sind es 8,0 Hz (Interquartilsabstand 0,7 Hz). Zur Übersicht werden die angeführten Ergebnisse in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 5: CBF bei 25 °C, 32 °C und 37 °C [Hz]

	25 °C	32 °C	37 °C
Mittelwert	7,2	7,6	8,1
Standardabweichung	0,6	0,6	0,7
Minimum	6,2	5,8	6,5
25%-Perzentile	6,8	7,3	7,7
Median	7,0	7,6	8,0
75%-Perzentile	7,6	7,9	8,4
Maximum	9,6	9,1	9,8

Aufgrund der fehlenden Normalverteilung (Kolmogorow-Smirnow-Test bei 25 °C: $p < 0,001$; 32 °C: $p = 0,036$; 37 °C: $p < 0,01$) wurden zur Prüfung der statistischen Signifikanz nicht parametrische Tests angewandt. Im gepaarten Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test entsprechen die Ergebnisse hochsignifikanten Unterschieden der CBF zwischen den Messtemperaturen 25 °C, 32 °C und 37 °C, jeweils mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,0001$. Dieses Ergebnis wurde mit dem Friedman-Test bestätigt. Abbildung 10 veranschaulicht die erhobenen Daten zur CBF bei 25 °C, 32 °C sowie 37 °C.

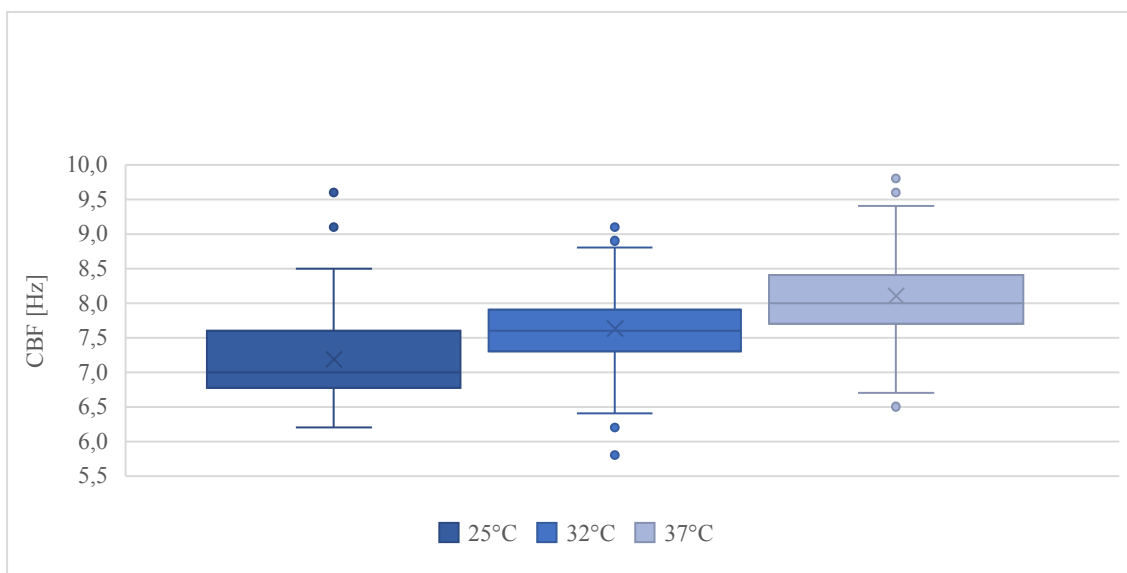


Abbildung 10: CBF bei 25 °C, 32 °C und 37 °C als Boxplot mit Median, 25%- und 75%-Perzentile [Hz]

Zusätzlich wurde die CBF bei den drei Temperaturen 25 °C, 32 °C und 37 °C in Abhängigkeit der aufsteigenden (↑) bzw. absteigenden (↓) Reihenfolge der Messungen betrachtet. Hier zeigt sich, dass bei der in aufsteigender (↑) Reihenfolge gemessenen

CBF keine Normalverteilung vorliegt (Kolmogorow-Smirnow-Test bei 25 °C↑: $p = 0,001$, 32 °C↑: $p = 0,049$, 37 °C↑: $p = 0,031$). Im Gegensatz dazu ist bei den in absteigender (↓) Reihenfolge gemessenen Werten eine Normalverteilung festzustellen (Kolmogorow-Smirnow-Test bei 25 °C↓: $p = 0,084$, 32 °C↓: $p = 0,10$, 37 °C↓: $p > 0,10$).

Die mittlere CBF (Median) bei 25 °C↑ liegt bei 6,9 Hz mit einem Interquartilsabstand von 0,6 Hz; bei 25 °C↓ beträgt der Median 7,3 Hz mit einem Interquartilsabstand von 0,9 Hz. Bei einer Temperatur von 32 °C und aufsteigender Messreihenfolge (32 °C↑) beträgt die mittlere CBF (Median) 7,5 Hz (Interquartilsabstand 0,4 Hz); bei absteigender Messreihenfolge (32 °C↓) zeigt sich ein Median von 7,7 Hz (Interquartilsabstand 0,7 Hz). Bei 37 °C↑ beträgt die mittlere CBF (Median) 7,8 Hz (Interquartilsabstand 0,5 Hz) und bei 37 °C↓ sind es 8,3 Hz (Interquartilsabstand 1,0 Hz). Tabelle 6 dient der übersichtlichen Darstellung dieser Ergebnisse.

Tabelle 6: CBF bei 25 °C↑, 25 °C↓, 32 °C↑, 32 °C↓, 37 °C↑ und 37 °C↓ [Hz]

	25 °C↑	25 °C↓	32 °C↑	32 °C↓	37 °C↑	37 °C↓
Mittelwert	7,0	7,3	7,5	7,8	7,8	8,4
Standardabweichung	0,6	0,6	0,5	0,7	0,5	0,7
Minimum	6,2	6,4	5,8	6,2	6,5	6,9
25%-Perzentile	6,6	6,9	7,3	7,3	7,6	7,8
Median	6,9	7,3	7,5	7,7	7,8	8,3
75%-Perzentile	7,2	7,8	7,7	8,0	8,1	8,8
Maximum	9,6	9,1	8,9	9,1	8,9	9,8

Auch hier zeigen sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Untergruppen bei den Temperaturen 25 °C, 32 °C und 37 °C. So fällt die CBF bei den in absteigender (↓) Reihenfolge durchgeführten Messungen bei allen Temperaturen statistisch signifikant höher aus (Irrtumswahrscheinlichkeit bei 25 °C: $p = 0,002$; 32 °C: $p < 0,050$; 37 °C: $p = 0,0001$). Abbildung 11 dient der Veranschaulichung dieser Ergebnisse.

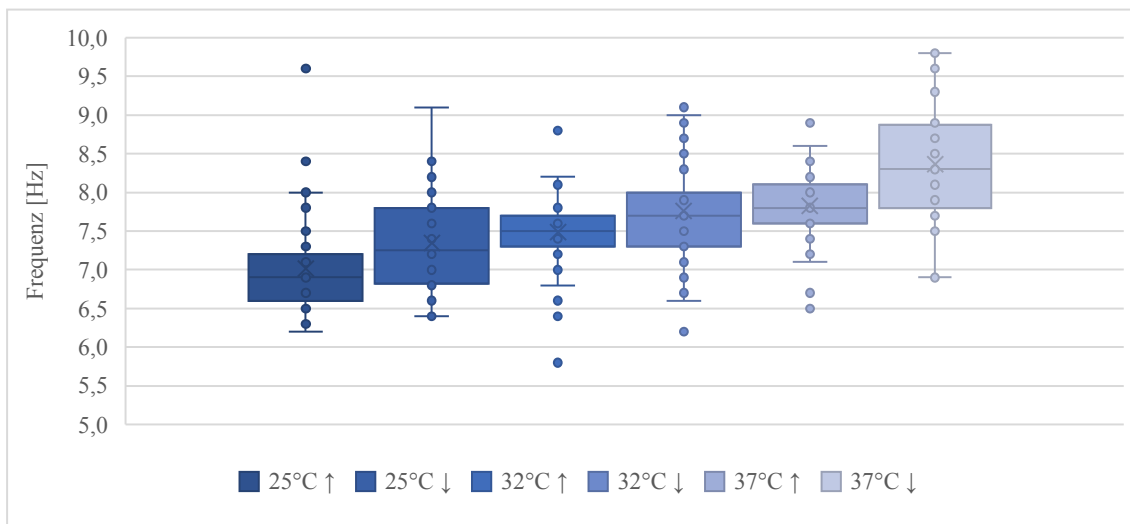


Abbildung 11: CBF bei 25 °C↑, 25 °C↓ 32 °C↑, 32 °C↓, 37 °C↑ und 37 °C↓ als Boxplot mit Median, 25%- und 75%-Perzentile [Hz]

3.2.1.2 Normwerterhebung

Da die Ergebnisse der CBF nicht normalverteilt sind, wurden die Normwerte der CBF als 95%-Konfidenzintervall definiert sowie als Intervall zwischen der 2,5%-Perzentile und der 97,5%-Perzentile mit Hilfe der folgenden Formel berechnet (Hyndman und Fan 1996):

$$R = P * (n + 1) / 100$$

Dabei entsprechen P = 2,5 % (untere Grenze) bzw. 97,5 % (obere Grenze) n = 100 Probanden. Daraus ergeben sich die in Tabelle 7 angegebenen Grenzwerte:

Tabelle 7: Normwerte der CBF bei 25 °C, 32 °C und 37 °C [Hz]

	2,5%-Perzentile	97,5%-Perzentile
25 °C	6,3	8,8
32 °C	6,3	9,0
37 °C	6,7	9,8

3.2.1.3 CBF in Abhängigkeit der Zeit ex vivo

Alle CBF-Messungen wurden innerhalb von 65 min nach der Entnahme der Bürstenbiopsie durchgeführt. Durch die Randomisierung der Temperaturreihenfolge befanden sich die Zellen während der Messung bei 25 °C durchschnittlich 25,5 min außerhalb des Körpers. Die Messung bei 32 °C fand durchschnittlich 24,5 min und die Messung bei

37 °C durchschnittlich 23,6 min nach der Entnahme statt. Diese Ergebnisse werden in Tabelle 8 detailliert dargestellt.

Tabelle 8: Zeit ex vivo bei 25 °C, 32 °C und 37 °C [min]

	25 °C	32 °C	37 °C
Mittelwert	25,5	24,5	23,6
Standardabweichung	22,5	4,2	22,8
Minimum	1,0	15,0	1,0
25%-Perzentile	2,0	21,0	2,0
Median	38,5	24,0	4,0
75%-Perzentile	46,3	26,0	46,3
Maximum	63,0	38,0	65,0

In Tabelle 9 finden sich zusätzlich Angaben zur Zeit, die von der Entnahme bis zur Messung bei den unterschiedlichen Messtemperaturen in Abhängigkeit von der aufsteigenden (↑) bzw. absteigenden (↓) Messreihenfolge vergangen ist. Bis auf die Zeit ex vivo bei 37 °C↑ ist hier keine Normalverteilung festzustellen (Kolmogorow-Smirnow-Test bei 25 °C↑: $p < 0,0001$, 25 °C↓: $p = 0,049$, 32 °C↑: $p = 0,032$, 32 °C↓: $p = 0,023$, 37 °C↑: $p > 0,10$, 37 °C↓: $p < 0,0001$).

Tabelle 9: Zeit ex vivo bei 25 °C, 32 °C und 37 °C. Darstellung getrennt nach auf- bzw. absteigender Temperaturreihenfolge [min]

	25 °C↑	25 °C↓	32 °C↑	32 °C↓	37 °C↑	37 °C↓
Mittelwert	2,6	46,6	26,3	22,9	46,8	2,2
Standardabweichung	2,0	6,1	4,3	3,4	6,2	1,3
Minimum	1,0	35,0	15,0	17,0	34,0	1,0
25%-Perzentile	1,0	43,0	23,8	20,0	42,0	1,0
Median	2,0	46,0	26,0	22,0	47,5	2,0
75%-Perzentile	3,3	50,0	29,0	25,0	51,0	3,0
Maximum	11,0	63,0	38,0	33,0	65,0	5,0

Für die Messung bei 25 °C↑ ergibt sich eine mittlere Zeit ex vivo (Median) von 2,0 min mit einem Interquartilsabstand von 2,3 min. Bei 25 °C↓ beträgt der Median 46,0 min (Interquartilsabstand 7,0 min). Bei 32 °C und aufsteigender Messreihenfolge (32 °C↑) vergingen im Mittel (Median) 26,0 min (Interquartilsabstand 5,2 min), bei absteigender

Messreihenfolge (32 °C↓) beträgt die mittlere (Median) Zeit ex vivo 22,0 min (Interquartilsabstand 5,0 min). Bei 37 °C↑ beläuft sich die Zeit ex vivo im Mittel (Median) auf 47,5 min (Interquartilsabstand 9,0 min) und bei 37 °C↓ ergibt sich eine mittlere (Median) Zeit ex vivo von 2,0 min (Interquartilsabstand 2,0 min).

Aufgrund der Art der Randomisierung ergibt sich in der Analyse der Untergruppen bei 25 °C und 37 °C eine statistisch signifikant kürzere Zeit ex vivo bei Messungen, die unmittelbar nach der Probenentnahme durchgeführt wurden. Daher ist die Zeit ex vivo bei 25 °C statistisch signifikant kürzer, wenn in aufsteigender Reihenfolge (25 °C↑) gemessen wurde ($p < 0,0001$). Im Gegensatz dazu ist die Zeit ex vivo bei 37 °C statistisch signifikant kürzer, wenn die Messung in absteigender Reihenfolge (37 °C) erfolgte ($p < 0,0001$). Bei 32 °C ist die Zeit ex vivo statistisch signifikant kürzer bei den in absteigender Reihenfolge (32 °C↓) durchgeführten Messungen ($p < 0,0001$). Zur Veranschaulichung dient Abbildung 12.

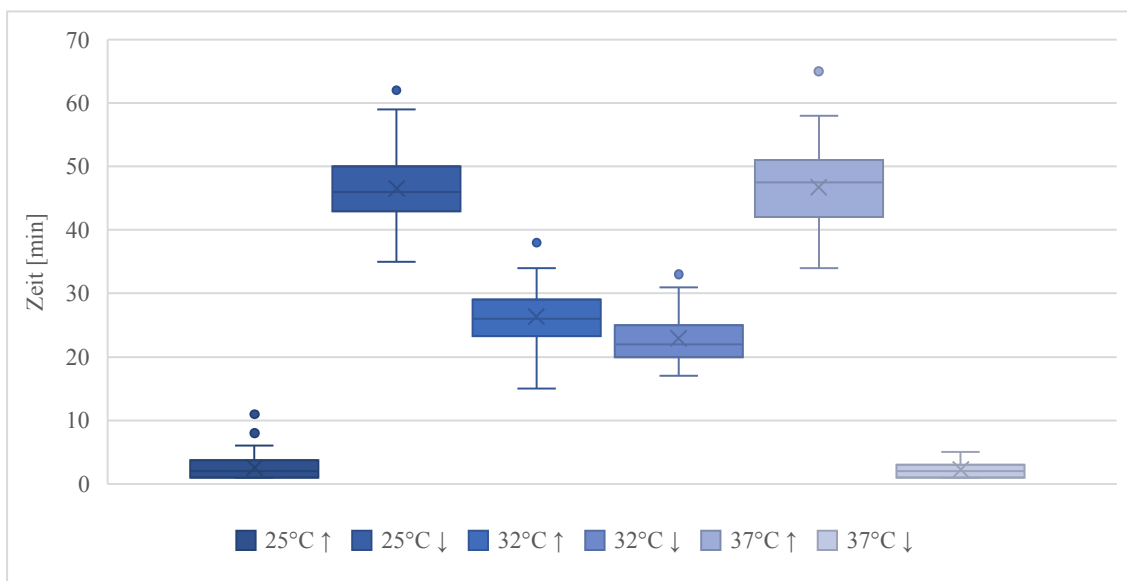


Abbildung 12: Zeit ex vivo bei 25 °C, 32 °C und 37 °C. Darstellung getrennt nach auf- bzw. absteigender Temperaturreihenfolge als Boxplot mit Median, 25%- und 75%-Perzentile [min]

Beim Vergleich der Zeiten ex vivo bei 25 °C↑ und 37 °C↓ – wenn die Messungen also jeweils zuerst durchgeführt wurden – ist kein statistisch signifikanter Unterschied festzustellen ($p = 0,584$). Dasselbe gilt für den Vergleich von 25 °C↓ und 37 °C↑, wenn die Messungen also jeweils zuletzt durchgeführt wurden ($p = 0,715$).

Dagegen zeigt sich bei der Untersuchung der Abhängigkeit der CBF von der Zeit ex vivo bei 25 °C eine statistisch signifikante Korrelation ($p = 0,0002$). Die Steigung der Korrelationslinie beträgt $+0,008$ (95%-Konfidenzintervall: $0,003$ bis $0,013$). Sie weicht statistisch signifikant von null ab ($p = 0,0032$).

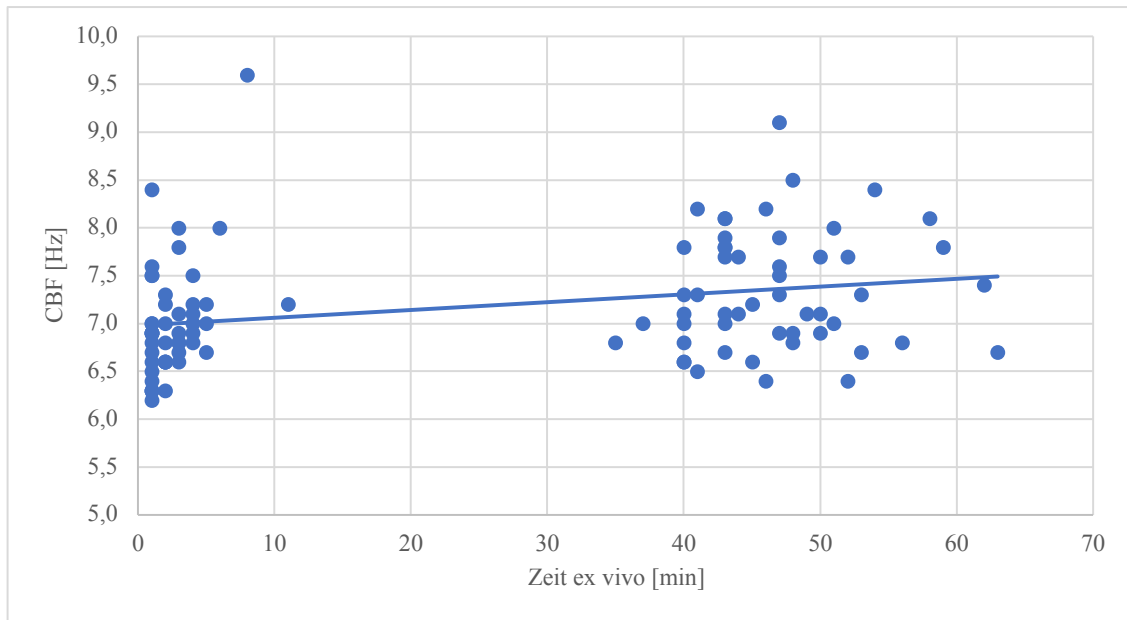


Abbildung 13: CBF in Abhängigkeit der Zeit ex vivo bei 25 °C [Hz]

Bei 32 °C lässt sich in Bezug auf den Zusammenhang zwischen der CBF und der Zeit ex vivo keine statistisch signifikante Korrelation feststellen ($p = 0,1621$). Hier beträgt die Steigung der berechneten linearen Assoziationsgeraden $-0,02355$ (95%-Konfidenzintervall: $-0,05255$ bis $0,005454$). Sie weicht nicht signifikant von null ab ($p = 0,1098$).

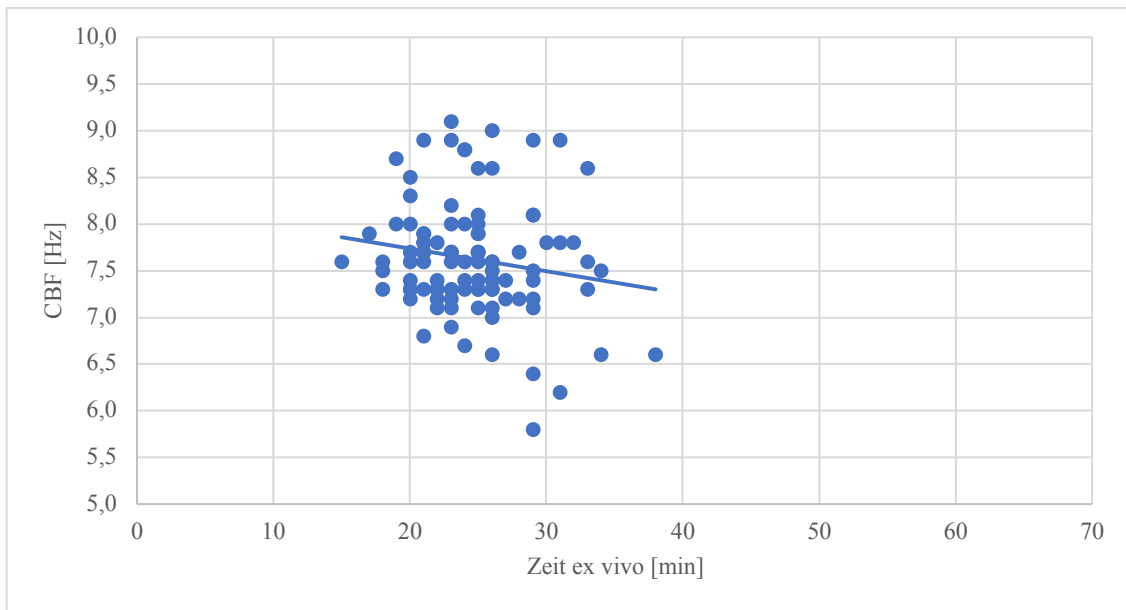


Abbildung 14: CBF in Abhängigkeit der Zeit ex vivo bei 32 °C [Hz]

Ähnlich wie bei 25 °C lässt sich auch bei 37 °C eine statistisch signifikante Korrelation zwischen CBF und der Zeit ex vivo nachweisen ($p < 0,0001$). Hier zeigt sich jedoch eine negative Steigung der Korrelationslinie von -0,01220 (95%-Konfidenzintervall: -0,01761 bis -0,006791), die statistisch signifikant von null abweicht ($p < 0,0001$).

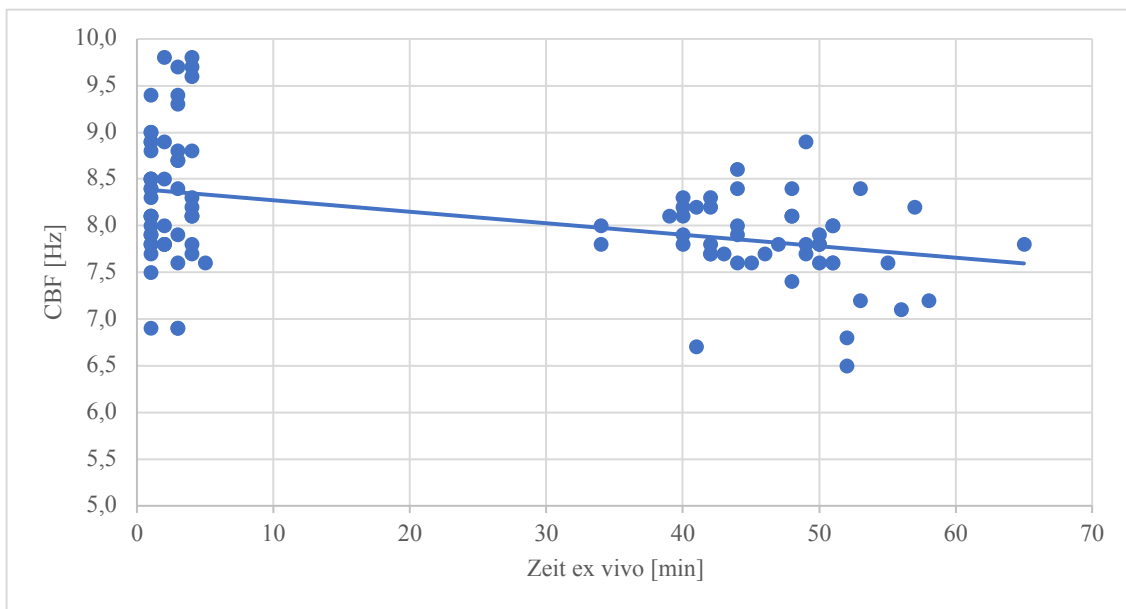


Abbildung 15: CBF in Abhängigkeit der Zeit ex vivo bei 37 °C [Hz]

3.2.1.4 CBF in Abhängigkeit vom Alter

Das mittlere Alter (Median) des beobachteten Probandenkollektivs liegt bei 23,5 Jahren. Die weiteren Werte werden in der folgenden Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Alter der Probanden [Jahre]

	Alter
Mittelwert	23,9
Standardabweichung	2,7
Minimum	20,2
25%-Perzentile	22,2
Median	23,5
75%-Perzentile	24,8
Maximum	31,9

Bei der Untersuchung der Abhängigkeit der CBF vom Alter der Probanden ist keine statistisch signifikante Korrelation festzustellen.

Bei 25 °C beträgt die Irrtumswahrscheinlichkeit $p = 0,0511$. Weiterhin beläuft sich die Steigung der berechneten Assoziationsgeraden auf $+0,0222$ (95%-Konfidenzintervall: $-0,025$ bis $0,069$), wobei sie nicht signifikant von null abweicht ($p = 0,348$). Für $X = 0$ Jahre ergibt der Schnittpunkt mit der Y-Achse eine Frequenz von 6,66 Hz.

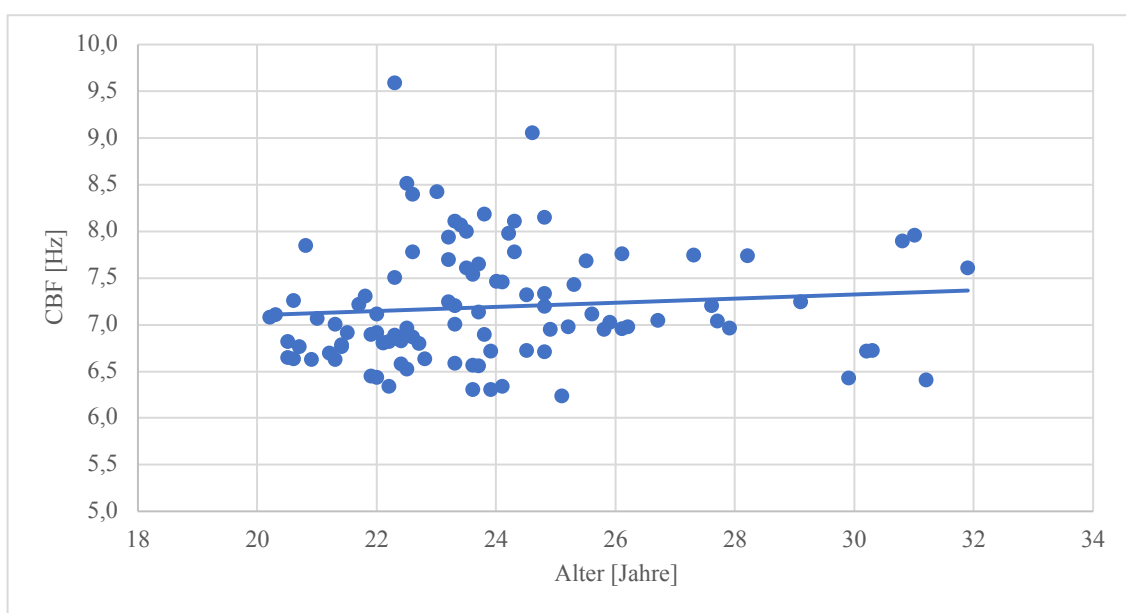


Abbildung 16: CBF in Abhängigkeit vom Alter bei 25 °C [Hz]

Ebenso ist bei 32 °C mit $p = 0,5205$ keine statistisch signifikante Korrelation zu verzeichnen. Die berechnete lineare Assoziationsgerade zeigt eine Steigung von 0,0001 (95%-Konfidenzintervall: -0,046 bis 0,047), sodass sie nicht signifikant von null abweicht ($p = 0,996$). Für $X = 0$ Jahre ergibt der Schnittpunkt mit der Y-Achse eine Frequenz von 7,62 Hz.

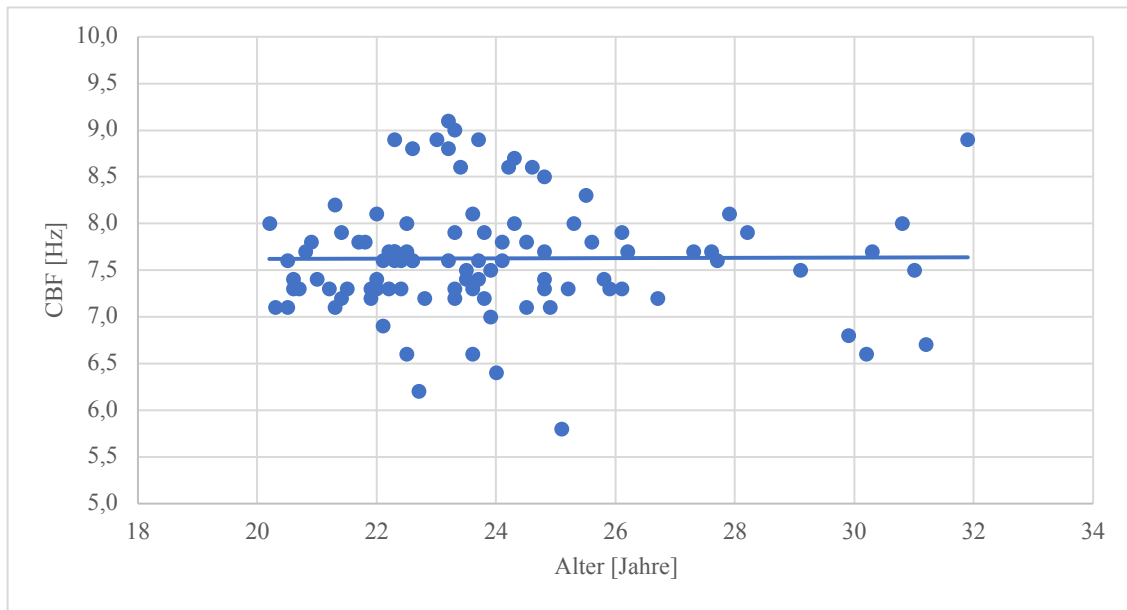


Abbildung 17: CBF in Abhängigkeit vom Alter bei 32 °C [Hz]

Auch bei 37 °C zeigt sich keine Korrelation von CBF und Alter ($p = 0,3358$). Die Steigung der berechneten linearen Assoziationsgeraden beträgt hier -0,0187 (95%-Konfidenzintervall: -0,069 bis 0,032), weicht aber auch nicht signifikant von null ab ($p = 0,466$). Für $X = 0$ Jahre ergibt der Schnittpunkt mit der Y-Achse eine Frequenz von 8,55 Hz

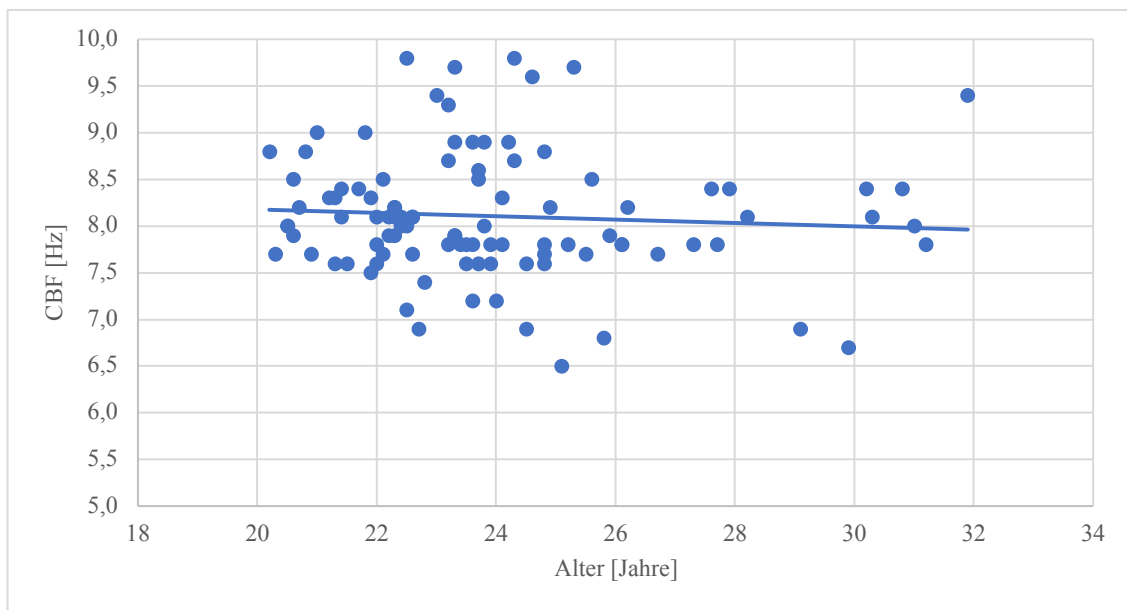


Abbildung 18: CBF in Abhängigkeit vom Alter bei 37 °C [Hz]

3.2.2 Nasenschleimhaut-Temperatur

Bei der Messung der Nasentemperatur (NT gesamt) konnten die folgenden Daten erhoben werden: Der Median beträgt 30,2 °C mit einem Interquartilsabstand von 3,5 °C. In der folgenden Tabelle 11 werden die Messergebnisse zusätzlich nach der Seite der Messung getrennt dargestellt. Außerdem dient der Boxplot in Abbildung 19 zur Veranschaulichung der Ergebnisse.

Tabelle 11: Nasenschleimhaut-Temperatur (NT) rechts, links und gesamt [°C]

	NT rechts	NT links	NT gesamt
Mittelwert	30,0	29,8	29,9
Standardabweichung	2,3	2,3	2,3
Minimum	24,9	24,5	24,7
25%-Perzentile	28,2	28,1	28,1
Median	30,6	30,1	30,2
75%-Perzentile	31,6	31,6	31,6
Maximum	35,8	35,8	35,8

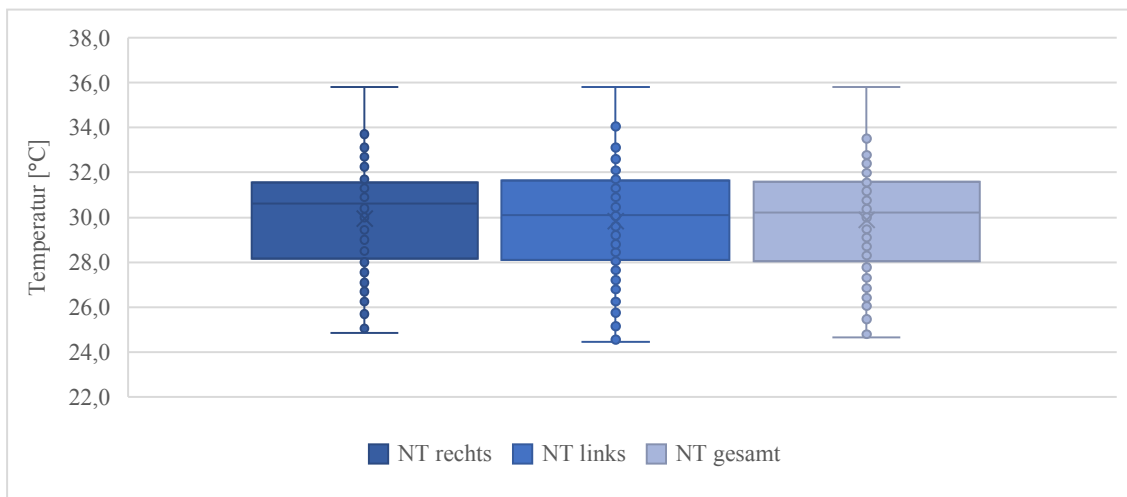


Abbildung 19: Nasenschleimhaut-Temperatur (NT) rechts, links und gesamt [°C]

Beim Vergleich der intranasalen Temperatur auf der rechten und auf der linken Seite zeigte sich ein statistisch signifikanter, wenn auch geringer Unterschied von $p = 0,0463$.

4 Diskussion

In Bezug auf die PCD-Diagnostik kommt der HSVA eine wegweisende Rolle zu. Sie ist die Untersuchungsmethode der Wahl bei Verdacht auf PCD (Nüßlein et al. 2013; Collins et al. 2014; Raidt et al. 2014).

Allerdings hat die vorhandene Datengrundlage bislang nicht ausgereicht, um entsprechende Referenzwerte zu etablieren. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass die Messungen unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt wurden (insbesondere ist in diesem Zusammenhang auf Abweichungen bezüglich der Temperatur hinzuweisen) (Raidt et al. 2014). Da die CBF jedoch in bedeutendem Maße von diesen Bedingungen abhängt, existieren keine einheitlichen Normwerte (Lucas et al. 2017).

In Anlehnung an die Empfehlung der European Respiratory Society (2017) zur Erhebung eigener Daten hat es sich die vorliegende Arbeit zum Ziel gesetzt, die Zilienschlagfrequenz von gesunden Probanden bei verschiedenen Untersuchungstemperaturen zu vergleichen und entsprechende Normwerte abzuleiten. Dabei wurden die am häufigsten verwendeten Messtemperaturen angewendet. Über eine nichtinvasive Methode wurde zusätzlich die tatsächliche Temperatur in den Nasengängen gemessen, um Rückschlüsse auf eine optimale Umgebungstemperatur für zukünftige Messungen zu ermöglichen. Zusätzlich wurde die Altersabhängigkeit der Zilienschlagfrequenz überprüft.

Im folgenden Abschnitt werden die in der Literatur publizierten Ergebnisse mit den erhobenen Daten verglichen und diskutiert.

4.1 Probandenkollektiv

Zur Beurteilung der ziliären Schlagfrequenz soll zunächst das Patientenkollektiv betrachtet werden, auf das die Werte anzuwenden sind. Da es sich bei der PCD um eine erbliche Erkrankung handelt, die bereits im frühesten Kindesalter diagnostiziert wird, würde es sich als vorteilhaft erweisen, die Normwerterhebung bei gesunden Kindern durchzuführen. Dieses Anliegen wurde jedoch von der Ethikkommission des Fachbereichs Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg nicht genehmigt. Daher beschränkt sich das ausgewählte Probandenkollektiv auf 100 junge, gesunde Erwachsene mit einem mittleren Alter (Median) von 23,5 Jahren (26 % Männer).

Die ungleiche Verteilung der Geschlechter ist dabei auf den Umstand zurückzuführen, dass sich mehr Frauen als Männer zu einer Teilnahme an der Studie bereit erklärt haben. Dabei kann diese Ungleichverteilung jedoch als nachrangig betrachtet werden, da bereits nachgewiesen wurde, dass das Geschlecht keinen Einfluss auf die CBF hat (Roth et al. 1991; Lee et al. 2004).

4.1.1 Anzahl

In Bezug auf die Anzahl der Probanden wurden in vergleichbaren Studien meist deutlich kleinere Kollektive von 20 Probanden und weniger untersucht (Chilvers und O’Callaghan 2000; Zhou et al. 2009; Raidt et al. 2014). Neben drei anderen Studien mit 80 (Roth et al. 1991) und 90 (Ho et al. 2001) gesunden Probanden bzw. 23 Erwachsenen und 53 Kindern (Chilvers et al. 2003) konnten in der vorliegenden Studie also vergleichsweise viele Messungen durchgeführt und entsprechend repräsentative Ergebnisse erzielt werden. Nichtsdestoweniger wären weitere Untersuchungen mit deutlich größeren Probandenkollektiven wünschenswert, um noch belastbarere Ergebnisse zu generieren.

Ungeachtet dessen ist festzustellen, dass eine ausreichend große, homogene Gruppe von erwachsenen Probanden untersucht wurde.

Daraus folgt jedoch auch, dass die in der vorliegenden Studie erhobenen Normwerte nur mit Vorbehalt auf Kinder angewandt werden können. So ist davon auszugehen, dass die tatsächlichen Normwerte bei Kindern höher liegen (vgl. Kapitel 4.3 ‚CBF in Abhängigkeit vom Alter‘).

Gleichwohl bieten die Ergebnisse valide und umfangreiche Bezugsmöglichkeiten für die Gruppe der erwachsenen Patienten.

4.2 CBF bei 25 °C, 32 °C und 37 °C

Die ermittelten Normwerte der CBF für 25 °C bewegen sich zwischen 6,3 und 8,8 Hz. In einer Studie von Raidt et al. (2014) wurden die Auswirkungen verschiedener genetischer Varianten auf die CBF und das Schlagmuster der Zilien untersucht. Die Proben der in dieser Studie untersuchten zehn Probanden, deren Alter nicht publiziert ist, wurden unter Verwendung von SAVA analysiert. Hierbei wurden die Zilien ebenfalls bei

einer Umgebungstemperatur von 25 °C untersucht. Es wurde eine mittlere CBF (Median) von 6,36 Hz festgestellt, die innerhalb der festgelegten Normwert-Grenzen liegt und sich somit mit den erzielten Ergebnissen deckt.

Zhou et al. (2009) untersuchten in ihrer Studie den Einfluss von Tabakrauch-Exposition auf die CBF. In der gesunden Nichtraucher-Gruppe von 21 Probanden mit einem mittleren Alter (Median) von 26 Jahren ergab sich hier eine CBF von $7,28 \pm 0,32$ Hz, gemessen bei 25 °C. Dieser Wert spiegelt eine vergleichbare Altersgruppe wider und wurde mit Hilfe derselben Messmethode erhoben. Er entspricht der bei 25 °C ermittelten mittleren CBF (Median) von 7,0 Hz und liegt innerhalb der erhobenen Normwert-Grenzen. In einer Studie von Sommer et al. (2010) wurde der Einfluss der vergangenen Zeit nach der Entnahme der Zellen auf die CBF untersucht. Die CBF von 19 Probanden konnten mit Hilfe von SAVA über einen Zeitraum von zwölf Stunden regelmäßig gemessen werden. Bei einer Temperatur von 21,5 °C ergab sich eine durchschnittliche CBF von $5,7 \pm 2,5$ Hz. Dieses Ergebnis liegt unterhalb der erhobenen unteren Normwert-Grenze, ein Umstand, der sich durch die lange Zeit nach der Entnahme wie auch die niedrigere Temperatur erklären lässt.

Bei einer Temperatur von 32 °C sollte die physiologische CBF den erzielten Ergebnissen zufolge zwischen 6,3 und 8,9 Hz liegen.

Die mit dieser Temperatur am ehesten zu vergleichende Studie wurde von Roth et al. (1991) bei 35 °C durchgeführt, also bei einer höheren Umgebungstemperatur als den in diesem Zusammenhang verwendeten 32 °C. Der hier zur Messung der CBF eingesetzte Photomultiplier zeigte für die mit dem ausgewählten Probandenkollektiv vergleichbare Gruppe der über 20-Jährigen eine CBF von $12,2 \pm 1,7$ Hz. Dieses Ergebnis liegt deutlich oberhalb der festgesetzten Normwert-Grenzen. Diese Abweichung lässt sich zum einen mit der oben erwähnten höheren Umgebungstemperatur und dem damit einhergehenden Anstieg der CBF erklären. Zum anderen ist in diesem Zusammenhang auf den Umstand hinzuweisen, dass im Rahmen der Untersuchung von einer abweichenden Messmethode Gebrauch gemacht wurde.

Die in der Literatur am häufigsten zur CBF-Messung verwendete Temperatur liegt jedoch bei 37 °C. Hier bewegen sich die ermittelten Normwerte zwischen 6,7 und 9,8 Hz. In einer Studie von Hesse et al. (1981) wurde die CBF von 20 ‚lungengesunden‘ Probanden im Alter von 20 bis 40 Jahren unter Verwendung eines Photomultipliers untersucht, wobei sich zehn Raucher unter den Probanden befanden. Bei den mit dem Pro-

bandenkollektiv zu vergleichenden zehn Nichtrauchern zeigte sich eine CBF von $13,2 \pm 2,8$ Hz. Hesse et al. merken hierzu selbst an, dass die untersuchte Gruppe zu klein sei, um Schlüsse aus den Ergebnissen zu ziehen.

Währenddessen ergaben die Messungen in der Studie von O'Callaghan et al. (1991), im Rahmen derer eine Photodiode zur Datenerhebung genutzt wurde, für die Gruppe der Erwachsenen mit einem durchschnittlichen Alter von 21 Jahren eine CBF von $11,1 \pm 0,84$ Hz bei 37 °C.

Agius et al. (1998) untersuchten in ihrer Studie 60 gesunde Personen (Kontroll-Gruppe) bei einer Temperatur von 37 °C per Photomultiplier. Das Ergebnis in dieser Gruppe lag bei einer CBF von $11,9 \pm 2,4$ Hz. Allerdings werden die Studien-Ergebnisse der gesunden Gruppe nicht nach dem Alter getrennt dargestellt, sodass in diesem Wert alle gesunden Probanden mit einem Alter von 2 bis 69 Jahren enthalten sind.

Auch Ho et al. (2001) führten ihre Messungen mit einem Photomultiplier bei 37 °C durch. Die durchschnittliche CBF der von ihnen untersuchten Probanden lag bei $13,0 \pm 1,7$ Hz, wobei vernachlässigbare zwei der 90 Probanden das Alter von 20 Jahren noch nicht erreicht hatten.

Alle in diesem Absatz dargestellten Ergebnisse überschreiten die im Rahmen der vorliegenden Untersuchung erhobenen Normwertgrenzen deutlich. Auch dies lässt sich jedoch hinreichend mit der Verwendung von Photomultiplier und Photodiode im Gegensatz zu dem verwendeten Programm SAVA erklären.

Im Gegensatz zu Photomultiplier und Photodiode nutzt die HSVA eine leistungsstarke High-Speed-Video-Kamera bei Verwendung unterschiedlicher Protokolle. Eine Möglichkeit zur Ermittlung der CBF bilden das manuelle Auszählen von Schlagzyklen in der Slow-Motion-Aufnahme der Zilien sowie eine darauf beruhende Berechnung der CBF.

Diese Methode verwendeten Chilvers und O'Callaghan (2000), als sie in einer Studie die Ergebnisse von Photomultiplier/-diode und HSVA miteinander verglichen. Die Autoren zeigen auf, dass sich die CBF von 20 gesunden Probanden im Alter von drei bis 38 Jahren bei 37 °C statistisch signifikant voneinander unterschied. Dabei ergaben die Messungen mit der HSVA ($13,2 \pm 2,9$ Hz) höhere Werte als die mit Photomultiplier ($12,0 \pm 2,4$ Hz) und Photodiode ($11,2 \pm 2,8$ Hz).

In einer weiteren, drei Jahre später durchgeführten Studie verglichen Chilvers et al. (2003) die CBF von Kindern mit derjenigen erwachsener Probanden. In dieser Studie kam zur Erfassung der CBF bei 37 °C ausschließlich die HSVA-Analyse zur Anwen-

dung. In der Gruppe der Erwachsenen zeigte sich nun eine durchschnittliche CBF von 11,4 Hz.

Auch Smith et al. (2011) griffen bei ihren Messungen auf die HSVA-Analyse zurück. Zwar zählten sie im Gegensatz zu den Studien von Chilvers et al., die 10 Schlagzyklen analysierten, lediglich fünf Schlagzyklen aus, jedoch kommen sie auf eine vergleichbare CBF von $11,8 \pm 2,5$ Hz. In dieser Studie wurden 14 Probanden im Alter zwischen einem und 25 Jahren (Median vier Jahre) eingeschlossen und die Messungen bei 37 °C durchgeführt.

Auch die Ergebnisse dieser drei Studien, die deutlich oberhalb der ermittelten Normwert-Grenzen liegen, wurden nicht mit Hilfe von SAVA erhoben.

Bereits Chilvers und O’Callaghan (2000) stellten für den Vergleich von HSVA (mit Auszählung der Schlagzyklen) mit Photomultiplier und Photodiode fest, dass Messungen, die nicht mit derselben Methode erhoben wurden, nicht miteinander verglichen werden können. Wie oben dargestellt, stimmen die ermittelten Werte mit denen anderer Studien überein, im Rahmen derer ebenfalls von SAVA als Mittel der Datenerhebung Gebrauch gemacht wurde.

Einzig Werte, die mit derselben Messmethode erhoben wurden, sind für den direkten Vergleich geeignet.

Die Heterogenität der verwendeten (HSVA-)Messprotokolle hat heterogene Ergebnisse zur Folge, was die Notwendigkeit verdeutlicht, Referenzwerte für jede Methode einzeln zu etablieren und diese mit Vorsicht anzuwenden (Chilvers und O’Callaghan 2000; Raidt et al. 2014).

4.2.1 CBF in Abhängigkeit von der Temperatur

Die Messung der CBF bei Verwendung unterschiedlicher Temperaturen (25 °C, 32 °C und 37 °C) ermöglichte die Überprüfung und Quantifizierung der Temperaturabhängigkeit der CBF, die bereits mehrfach in der Literatur beschrieben ist. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine mittlere CBF (Median) von 7,0 Hz bei 25 °C, 7,6 Hz bei 32 °C und 8,0 Hz bei 37 °C.

Dies entspricht statistisch hochsignifikanten Unterschieden, wobei die jeweilige Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,0001$ beträgt.

Diese Tatsache wurde bereits von Hesse et al. (1981) dargestellt. In ihren Messungen zeigte sich zwischen 30 °C und 40 °C eine beinahe lineare Beziehung zwischen CBF und Temperatur. Außerdem betrug die CBF bei 37 °C fast exakt das Doppelte (etwa 13,5 Hz) der CBF bei 20 °C (etwa 6,75 Hz).

Ähnliche Ergebnisse lieferte die Studie von Jorissen und Bessems (1995). Hier konnte zwischen 20 °C und 35 °C ein linearer Anstieg von 0,6 Hz/°C festgestellt werden. Dieser Anstieg flachte bei höheren Temperaturen auf etwa 0,25 Hz/°C ab.

Auch Smith et al. (2011) untersuchten in ihrer Studie die Temperaturabhängigkeit der CBF. Konkret wurden Temperaturen zwischen 2 °C und 37 °C zugrunde gelegt. Die Untersuchung kommt zu dem Ergebnis, dass eine statistisch signifikante sigmoidale Beziehung zwischen der CBF sowie Temperaturen zwischen 2 °C und 37 °C besteht. Dabei war bei Temperaturen zwischen 7 °C und 32 °C eine lineare Beziehung zu verzeichnen. Dieser Effekt war sowohl bei aufsteigenden als auch bei absteigenden Temperaturen zu beobachten.

Somit ermöglichen die vorliegenden Resultate erstmals seit mehreren Jahren eine Bestätigung wie auch eine Aktualisierung der in der Literatur publizierten Ergebnisse.

Hierdurch wird erneut die Dringlichkeit unterstrichen, ausschließlich Normwerte der jeweiligen Temperatur für die Bewertung der CBF heranzuziehen.

4.2.2 CBF in Abhängigkeit von der Zeit ex vivo

Die Entnahme der Zilien-tragenden Zellen aus der Nasenschleimhaut stellt eine Veränderung der Umgebung dar, sodass untersucht werden muss, inwiefern die Zeit ex vivo einen signifikanten Einfluss auf die Schlagfrequenz der Zilien hat.

Dieser Einfluss wurde in einer Studie von Sommer et al. (2010) untersucht. Dabei wurden 19 Proben über einen Zeitraum von zwölf Stunden und bei durchschnittlich 21,5 °C einer regelmäßigen Untersuchung unterzogen. Zwei Proben wurden darüber hinaus über einen Zeitraum von 24 Stunden untersucht. Wie der Studie zu entnehmen ist, steigt die CBF innerhalb der ersten drei Stunden um $2,4 \pm 2,5$ Hz gegenüber der Startfrequenz von etwa $5,6 \pm 4,2$ Hz an. Danach war im Zeitraum zwischen drei und neun Stunden ein stabiles Frequenzplateau zu beobachten. Nach neun Stunden begann die Frequenz kon-

stant zu sinken, bis nach zwölf Stunden wieder die Startfrequenz erreicht wurde. Den Daten der beiden länger beobachteten Proben war zu entnehmen, dass sich dieser Abwärtstrend fortsetzte, bis nach 20 Stunden kaum noch motile Zilien und nach 24 Stunden keine motilen Zilien mehr zu beobachten waren.

Hesse et al. (1981) untersuchten in einer Studie zur Messung der Ziliarfrequenz 20 Proben bei 37 °C. Die Messungen wurden alle 20 min über einen Zeitraum von 160 min durchgeführt. Sie konnten in diesem Zeitraum keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Schlagfrequenz feststellen.

Bei den durchgeführten Untersuchungen zeigte die CBF in Abhängigkeit der Zeit ex vivo bei 25 °C eine statistisch signifikante Korrelation ($p = 0,0002$) mit einer Steigung von $+0,008$. Somit nahm die Geschwindigkeit der CBF zu, je länger sich die Zellen außerhalb des Körpers befanden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Zilien-tragenden Zellen bei 25 °C, also bei geringeren Temperaturen, über eine bessere Regenerations- und Schlagfähigkeit verfügen, sodass sie die CBF besser stabil halten können. Die geschilderten Beobachtungen decken sich mit den oben dargestellten Ergebnissen von Sommer et al., die auch bei einer vergleichsweise niedrigen Temperatur von 21,5 °C erhoben wurden.

Bei 32 °C war in Bezug auf den Zusammenhang zwischen der CBF und der Zeit ex vivo keine statistisch signifikante Korrelation festzustellen ($p = 0,1621$).

Bei 37 °C war es – anders als bei 25 °C – möglich, eine statistisch signifikante ($p < 0,0001$) Korrelation zwischen CBF und der Zeit ex vivo mit einer negativen Steigung von $-0,01220$ nachzuweisen. In diesem Fall war die CBF also geringer, je länger sich die Zellen ex vivo befanden. Dies deutet darauf hin, dass die wärmere Temperatur von 37 °C die Zellen in ihrer Schlagfähigkeit einschränkt, sodass sie sich schneller erschöpfen. Wie oben dargestellt, konnten Hesse et al. bei dieser Temperatur zwar keine Senkung, jedoch auch keine Steigerung der CBF beobachten.

4.3 CBF in Abhängigkeit vom Alter

In Bezug auf das Alter der untersuchten Personen wurde bereits mehrfach eine Abhängigkeit der CBF belegt.

Roth et al. (1991) untersuchten in ihrer Studie 80 gesunde Probanden im Alter zwischen 10 und 80 Jahren. Sie stellten fest, dass die CBF der Probanden unter 20 Jahren statis-

tisch signifikant ($p < 0,001$) – nämlich durchschnittlich $13,6 \pm 1,5$ Hz – höher lag als bei den Probanden über 20 Jahren mit $12,2 \pm 1,7$ Hz.

Eine weitere Studie verglich die CBF von 31 Neugeborenen mit derjenigen von 14 Erwachsenen. Auch hier konnte festgestellt werden, dass sich die Ergebnisse der Neugeborenen ($12,7 \pm 0,82$ Hz) statistisch signifikant ($p < 0,01$) von denjenigen der Erwachsenen ($11,1 \pm 0,84$ Hz) unterschieden (O’Callaghan et al. 1991).

Auch Chilvers et al. (2003) verglichen die CBF von 53 Kindern mit derjenigen von 23 Erwachsenen und auch hier ließ sich ein statistisch signifikanter ($p < 0,01$) Altersunterschied in der CBF feststellen. Die mittlere CBF (Mittelwert) bei den unter 18-Jährigen lag hier bei 12,8 Hz, während sie bei den über 18-Jährigen bei 11,4 Hz lag.

Denselben Trend stellten Ho et al. (2001) fest, wobei sie die Altersgrenze bei 40 Jahren festlegten. Probanden im Alter über 40 Jahren hatten in dieser Studie eine statistisch signifikant ($p < 0,001$) niedrigere CBF ($12,2 \pm 1,7$ Hz) als Probanden, die das 40. Lebensjahr noch nicht vollendet hatten ($13,9 \pm 1,4$ Hz).

In einer Studie von Jorissen et al. (1998) konnte hingegen keine Altersabhängigkeit festgestellt werden. Allerdings wurden in dieser Studie auch die Proben von Patienten (im Alter zwischen drei Monaten und 74 Jahren) untersucht, die wegen ungeklärten wiederkehrenden Infektionen der oberen und/oder unteren Atemwege zur Abklärung einer Primären oder Sekundären Ciliären Dyskinesie (PCD/SCD) vorstellig geworden waren. Für die Bewertung der CBF wurden hier zwar die Patienten mit PCD ausgeschlossen; gleichwohl lag bei den in die Studie aufgenommenen Patienten eine Gesundheitsbeeinträchtigung vor. Dies lässt sich auch daran erkennen, dass in den Biopsien mehr als 25 % der Zellen eine SCD aufwiesen. Weiterhin konnte nur etwa ein Drittel der 113 Proben als Zellen mit ‚normaler‘ Ultrastruktur eingestuft werden (entsprechend < 5 % Zellen mit SCD).

In der vorliegenden Studie konnte bei allen drei untersuchten Temperaturen keine statistisch signifikante Altersabhängigkeit der CBF innerhalb der untersuchten Altersgruppe nachgewiesen werden. Auch bei der Berechnung einer möglichen CBF im Kindesalter mit Hilfe einer Trendlinie zeigte sich jeweils für ein Alter von 0 Jahren kein direkter Hinweis auf eine geringere CBF. Dieses Ergebnis lässt sich jedoch aufgrund der fehlenden Korrelation nur eingeschränkt beurteilen.

Als ursächlich sind hier die Einschränkungen des Ethikrates sowie die daraus resultierende Begrenzung der Altersgruppe zu benennen. Die untersuchten Probanden befanden

sich im Alter zwischen 20 und 31 Jahren und wären somit in den vorgenannten Studien von Roth et al. (1991), O’Callaghan et al. (1991) sowie Chilvers et al. (2003) jeweils der älteren Vergleichsgruppe der Erwachsenen zugeordnet worden. Innerhalb dieser Altersgruppe konnte somit auch in diesen Studien keine Altersabhängigkeit nachgewiesen werden.

Weiterhin ist anzunehmen, dass die untersuchte Altersspanne zu kurz ist, um Unterschiede feststellen zu können. Demnach sollten weitere Studien durchgeführt werden, im Rahmen derer zusätzlich die CBF von Kindern untersucht wird.

4.4 Intranasale Temperatur

Die Temperatur im Inneren der Nase wurde in der Vergangenheit bereits zum Thema verschiedener Studien gemacht.

So führten Keck et al. (2000) eine Studie durch, in der sie die endinspiratorische Temperatur in verschiedenen Abschnitten der Naseninnenräume maßen. Sie kamen dabei zu dem Ergebnis, dass die Temperatur von $25,3 \pm 2,1$ °C im *Vestibulum nasi* über $29,8 \pm 2,5$ °C auf Höhe des *Ostium internum* und $32,3 \pm 2,2$ °C auf Höhe des *Meatus nasi medius* bis hin zu $33,9 \pm 1,5$ °C im *Nasopharynx* ansteigt.

Auch Lindemann et al. gelangten in ihren Studien (2002; 2007) zur Temperatur der Nasenschleimhaut zu ähnlichen Ergebnissen. Hier lag die Schleimhauttemperatur während der Inspiration im *Vestibulum nasi* und im vorderen Bereich der Nasengänge bei $30,2 \pm 1,7$ °C, um dann bis zum *Nasopharynx* auf $33,2 \pm 2,3$ °C anzusteigen. Nach der Expiration war im *Vestibulum nasi* eine Temperatur von 32,2 °C (Spannweite 31,0–33,9 °C) festzustellen.

In einer weiteren Studie von Bailey et al. (2017) über die Korrelation von Nasenschleimhauttemperatur und der subjektiven Nasendurchgängigkeit bei 22 gesunden Probanden konnten ähnliche Werte dokumentiert werden. Die im vorderen Bereich der Nasengänge gemessenen Temperaturen lagen zwischen $30,0 \pm 2,3$ °C (endinspiratorisch) und $34,1 \pm 1,8$ °C (endexpiratorisch).

Die im Rahmen der vorliegenden Studie erhobenen Ergebnisse dienten einer orientierenden Messung der Nasentemperatur und wurden mit einem handelsüblichen Infrarotthermometer gemessen. Vor diesem Hintergrund ist davon auszugehen, dass die eigent-

liche Messung bis auf Höhe des *Ostitum internum* reicht und dass sie vergleichsweise ungenau ausfällt. Dennoch stimmt das aus beiden Seiten gemittelte Ergebnis von 30,2 °C gut mit den Ergebnissen von Keck et al. (2000), Lindemann et al. (2002; 2007) sowie Bailey et al. (2017) überein.

Da die Proben im Rahmen der vorliegenden Studie jedoch aus dem *Meatus nasi inferior*, also den weiter innen gelegenen Nasengängen entnommen wurden, in denen auch die Messungen der oben genannten Studien durchgeführt wurden, erscheint die gewählte mittlere Temperatur von 32 °C für die Messung der CBF sinnvoll.

Zwar zeigte sich beim Vergleich der Messungen der rechten (Median: 30,6 °C) und linken (Median: 30,1 °C) Seite ein geringer statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,0463$), jedoch lag die Temperatur in beiden Fällen deutlich am nächsten an der Messtemperatur von 32 °C.

Die kleinste gewählte Temperatur von 25 °C entspricht dagegen am ehesten der Raumtemperatur und erscheint deshalb für die Messung der CBF zu niedrig. Dies gilt insbesondere in Anbetracht des raschen Anwärmens der Luft in der Nase (Keck et al. 2000; Lindemann et al. 2002).

Im Gegensatz dazu entspricht die höchste gewählte Temperatur von 37 °C in etwa der Körpertemperatur; diese erscheint angesichts der Ergebnisse der Studien von Keck et al. (2000), Lindemann et al. (2002; 2007) und Bailey et al. (2017) als zu hoch.

Es ließe sich argumentieren, dass Messungen, die bei Temperaturen unter bzw. über der physiologischen Nasentemperatur durchgeführt wurden, nicht aussagekräftig sind. Folglich scheint die Temperatur von 32 °C zur Messung der CBF optimal.

Nichtsdestoweniger sind auch die Messungen der CBF bei 25 °C und 37 °C von Interesse, da die Ergebnisse nur so mit anderen Messungen verglichen werden können, die bei diesen Temperaturen durchgeführt wurden.

4.5 Methodenkritik

Bei der Beurteilung möglicher Fehlerquellen ist darauf hinzuweisen, dass die Messung der CBF mit SAVA die manuelle Auswahl eines ROI voraussetzt. Dabei besteht die Gefahr eines Bias, da das menschliche Auge zu Objekten hingezogen wird, die sich mit hoher Geschwindigkeit bewegen. Dieser Umstand sollte dadurch abgemildert werden,

dass pro Proband und Temperatur jeweils fünf verschiedene Zilien-tragende Zellen mit jeweils zwei ROI untersucht wurden. So gingen in jeden CBF-Wert eines Probanden zehn Messungen ein.

Die dabei gesetzten Grenzen einer Wert-Abweichung von 10 % innerhalb der beiden ROI einer Zelle und einer Wert-Abweichung von 20 % innerhalb der fünf Zellen der gleichen Temperatur sind willkürlich, dienen jedoch dem Zweck, möglichst reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen.

Weiterhin wird empfohlen, zur Beurteilung der Zilienschlagfrequenz neben der direkten HSVA auch eine Zellkultur anzulegen und zu untersuchen. Da dies zwar für bestimmte diagnostische Fragestellungen von Bedeutung, jedoch als Screening-Methode nicht sinnvoll ist, wurde im Rahmen der vorliegenden Studie auf die Ansetzung einer solchen Zellkultur verzichtet.

4.6 Schlussfolgerung

Wie zu Beginn dieser Arbeit dargestellt, spielt die HSVA bei der Diagnostik der PCD eine herausragende Rolle. Jedoch fehlt es in der aktuellen Literatur an vergleichbaren und reproduzierbaren Referenzwerten zur Beurteilung der mittels HSVA gemessenen Werte. Wie in der 2017 publizierten Leitlinie der European Respiratory Society empfohlen, wurde daher die Festsetzung von Normwerten vorgenommen. Den vorliegenden Ergebnissen zufolge sollte die CBF bei 25 °C zwischen 6,3 Hz und 8,8 Hz liegen. Bei 32 °C zeigten sich Normwerte von 6,3 bis 9,0 Hz und bei einer Umgebungstemperatur von 37 °C beträgt die physiologische CBF 6,7 bis 9,8 Hz. Dementsprechend hat die Temperatur statistisch hochsignifikante Unterschiede der CBF zur Folge. Bei der Messung der Nasentemperatur zeigte sich eine mittlere Temperatur (Median) von 30,2 °C.

Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit lassen deutliche Aussagen in Bezug auf die ziliäre Schlagfrequenz zu und beantworten die zu Beginn gestellten Fragestellungen. So konnten Normwerte für die ziliäre Schlagfrequenz sowohl für 25 °C als auch für 32 °C und 37 °C ermittelt werden. Demnach ist seit längerer Zeit erstmals wieder der Nachweis gelungen, dass die ziliäre Schlagfrequenz maßgeblich von der Umgebungstemperatur abhängig ist.

Zusätzlich konnte durch die orientierende, nichtinvasive Messung der Nasentemperatur ein Eindruck bezüglich der in den Naseninnenräumen tatsächlich herrschenden Temperatur gewonnen und mit Hilfe der Angaben in der Literatur eine optimale Temperatur von 32 °C für zukünftige Datenerhebungen bestimmt werden.

Da sich die Untersuchung aufgrund der Entscheidung der Ethikkommission ausschließlich auf erwachsene Probanden beschränkte, können die erstellten Normwerte leider auch ausschließlich auf das entsprechende Patientenkollektiv angewandt werden. Da in der Literatur verschiedentlich auf die Altersabhängigkeit der CBF hingewiesen wird, bleibt die Notwendigkeit einer Ermittlung von Normwerten für das bedeutendste Patientenkollektiv der CBF – die Kinder – unverändert bestehen.

5 Zusammenfassung

Die Primäre Ciliäre Dyskinesie ist eine seltene genetische Erkrankung, die auf Ziliendefekten beruht. Neben weiteren Symptomen beeinflusst sie insbesondere die mukoziliäre Clearance der Lunge, was zu wiederkehrenden Atemwegsinfektionen führt. Unter der Annahme, dass eine große Anzahl von Fällen nicht diagnostiziert wird, ist davon auszugehen, dass die geschätzte Prävalenz von etwa 1:20 000 zu gering ausfällt.

Die High-Speed-Video-Analyse, als Untersuchungsmethode der Wahl bei Verdacht auf Primäre Ciliäre Dyskinesie wird in unterschiedlichen Zentren bei verschiedenen Mess-temperaturen angewandt. Vergleichende Untersuchungen wurden bislang nicht publiziert. Vor diesem Hintergrund hat die European Respiratory Society den einzelnen Zentren in ihrer 2017 publizierten Leitlinie zur Diagnostik der Primäre Ciliäre Dyskinesie empfohlen eigene Normwerte zu erheben, bis eine Standardisierung der Methodik erreicht wurde.

Vor diesem Hintergrund hat es sich die vorliegende Arbeit zum Ziel gesetzt, die ziliäre Schlagfrequenz bei verschiedenen Messtemperaturen zu bestimmen und entsprechende Normwerte bei jungen Erwachsenen zu erheben. Zusätzlich wurde die tatsächliche Temperatur in den Nasengängen mittels einer nichtinvasiven Methode bestimmt.

Es wurden Bürstenbiopsien von 100 gesunden, erwachsenen Probanden gewonnen und analysiert. Die mittlere ziliäre Schlagfrequenz (Median) reichte von 7,0 Hz (25 °C) über 7,6 Hz (32 °C) bis hin zu 8,0 Hz (37 °C) und zeigte einen statistisch signifikanten Anstieg bei steigender Temperatur. Dies erlaubte die Feststellung von Normwerten der ziliären Schlagfrequenz mit den folgenden Grenzen: 25 °C: 6,3–8,8 Hz; 32 °C: 6,3–9,0 Hz und 37 °C: 6,7–9,8 Hz. Während einige Studien unter Verwendung anderer Messmethoden höhere Ergebnisse erzielten, decken sich die Resultate der vorliegenden Studie mit denjenigen von Studien, die auf derselben Messmethode basieren.

Zusätzlich ergab sich eine mittlere Nasentemperatur (Median) von 30,2 °C, was mit den Ergebnissen anderer Studien übereinstimmt und eine Empfehlung von 32 °C als Umgebungstemperatur für zukünftige Messungen sinnvoll erscheinen lässt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich aus der vorliegenden Studie umfassende Erkenntnisse zu den Normwerten der ziliären Schlagfrequenz ableiten lassen, wobei

diese vornehmlich auf erwachsene Patienten angewandt werden sollten. Außerdem tragen die Ergebnisse zum Verständnis der Einflussfaktoren auf die ziliäre Schlagfrequenz bei und erlauben die Formulierung einer Empfehlung für die Durchführung zukünftiger Messungen.

6 Summary

Primary ciliary dyskinesia is a rare genetic disorder, which originates in ciliary defects that affects mucociliary clearance of the lung and causes recurrent infections of the respiratory tract alongside with other symptoms. Considering that a striking number of cases is not diagnosed, it can be assumed that the prevalence of about 1:20.000 is underestimated. High-Speed video analysis is the firstline method in case of suspected primary ciliary dyskinesia but provides different results depending on the method used to measure ciliary beat frequency. Therefore, the guidelines of the European Respiratory Society for diagnosis of primary ciliary dyskinesia (2017) recommended for each center to define their own normative data until a consensus is reached to allow standardisation of the methods.

According to the guidelines, it was the aim of this study to establish normative data for ciliary beat frequency, to analyse temperature-dependency of ciliary beat frequency and to measure the temperature in the nasal cavity with a noninvasive method.

Nasal brushings taken from 100 healthy adults, age range 20,2 – 31,9 years, were analyzed. The median ciliary beat frequency was 7,0 Hz at 25 °C, 7,6 Hz at 32 °C and 8,0 Hz at 37 °C. The differences were statistically significant among the three temperatures ($p < 0,0001$). The calculation of normative values revealed the following ranges of the ciliary beat frequency: 25 °C: 6,3 - 8,8 Hz; 32 °C: 6,3 – 9,0 Hz und 37 °C: 6,7 - 9,8 Hz. Except for a few studies that showed higher results but used different methods, our own data were well in accordance with those that used the same method for measuring ciliary beat frequency. In addition, we measured a median temperature of 30,2 °C at the nasal mucosa, which matches the results of other studies and allows the recommendation of 32 °C as optimal temperature to measure ciliary beat frequency.

In conclusion this study helps to determine normative data of ciliary beat frequency not only in our own institution but can also contribute to establish a consensus among the different centers for the future.

7 Literaturverzeichnis

- Afzelius** BA (1999): Asymmetry of cilia and of mice and men. *Int J Dev Biol* 43, 283–286
- Afzelius** BA, Eliasson R (1983): Male and female infertility problems in the immotile-cilia syndrome. *Eur J Respir Dis Suppl* 127, 144–147
- Afzelius** BA, Mossberg B (1995): Immotile-cilia syndrome (primary ciliary dyskinesia), including Kartagener syndrome. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* 3943–3954
- Agius**, Smallman, Pahor (1998): Age, smoking and nasal ciliary beat frequency. *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences* 23, 227–230
- Austin-Tse** C, Halbritter J, Zariwala MA, Gilberti RM, Gee HY, Hellman N, Pathak N, Liu Y, Panizzi JR, Patel-King RS, et al. (2013): Zebrafish Ciliopathy Screen Plus Human Mutational Analysis Identifies C21orf59 and CCDC65 Defects as Causing Primary Ciliary Dyskinesia. *The American Journal of Human Genetics* 93, 672–686
- Bailey** RS, Casey KP, Pawar SS, Garcia GJM (2017): Correlation of Nasal Mucosal Temperature With Subjective Nasal Patency in Healthy Individuals. *JAMA Facial Plastic Surgery*
- Barbato** A, Frischer T, Kuehni CE, Snijders D, Azevedo I, Baktai G, Bartoloni L, Eber E, Escribano A, Haarman E, et al. (2009): Primary ciliary dyskinesia: a consensus statement on diagnostic and treatment approaches in children. *European Respiratory Journal* 34, 1264–1276
- Baz-Redón** N, Rovira-Amigo S, Paramonov I, Castillo-Corullón S, Cols Roig M, Antolín M, García Arumí E, Torrent-Vernetta A, de Mir Messa I, Gartner S, et al. (2020): Implementation of a Gene Panel for Genetic Diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia. *Archivos de Bronconeumología*
- Becker-Heck** A, Zohn IE, Okabe N, Pollock A, Lenhart KB, Sullivan-Brown J, McSheene J, Loges NT, Olbrich H, Haeffner K, et al. (2011): The coiled-coil domain containing protein CCDC40 is essential for motile cilia function and left-right axis formation. *Nat Genet* 43, 79–84
- Besharse** JC, Horst CJ: The Photoreceptor Connecting Cilium A Model for the Transition Zone. In: Bloodgood RA (Hrsg.): *Ciliary and Flagellar Membranes*. Springer US, Boston, MA 1990, 389–417

- Boon** M, Wallmeier J, Ma L, Loges NT, Jaspers M, Olbrich H, Dougherty GW, Raidt J, Werner C, Amirav I, et al. (2014): MCIDAS mutations result in a mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nat Commun* 5, 1–8
- Budny** B, Chen W, Omran H, Fliegauf M, Tzschach A, Wisniewska M, Jensen LR, Raynaud M, Shoichet SA, Badura M, et al. (2006): A novel X-linked recessive mental retardation syndrome comprising macrocephaly and ciliary dysfunction is allelic to oral–facial–digital type I syndrome. *Hum Genet* 120, 171–178
- Bush** A, Chodhari R, Collins N, Copeland F, Hall P, Harcourt J, Hariri M, Hogg C, Lucas J, Mitchison HM, et al. (2007): Primary ciliary dyskinesia: current state of the art. *Arch Dis Child* 92, 1136–1140
- Castleman** VH, Romio L, Chodhari R, Hirst RA, de Castro SCP, Parker KA, Ybot-Gonzalez P, Emes RD, Wilson SW, Wallis C, et al. (2009): Mutations in Radial Spoke Head Protein Genes RSPH9 and RSPH4A Cause Primary Ciliary Dyskinesia with Central-Microtubular-Pair Abnormalities. *Am J Hum Genet* 84, 197–209
- Chilvers**, Rutman A, O’Callaghan C (2003): Functional analysis of cilia and ciliated epithelial ultrastructure in healthy children and young adults. *Thorax* 58, 333–338
- Chilvers** M, O’Callaghan C (2000): Analysis of ciliary beat pattern and beat frequency using digital high speed imaging: comparison with the photomultiplier and photodiode methods. *Thorax* 55, 314–317
- Chilvers** MA, Rutman A, O’Callaghan C (2003): Ciliary beat pattern is associated with specific ultrastructural defects in primary ciliary dyskinesia. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 112, 518–524
- Collins** SA, Walker WT, Lucas JS (2014): Genetic Testing in the Diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia: State-of-the-Art and Future Perspectives. *Journal of Clinical Medicine* 3, 491–503
- Coren** ME, Meeks M, Morrison I, Buchdahl RM, Bush A (2002): Primary ciliary dyskinesia: age at diagnosis and symptom history. *Acta Paediatrica* 91, 667–669
- Davis** SD, Ferkol TW, Rosenfeld M, Lee H-S, Dell SD, Sagel SD, Milla C, Zariwala MA, Pittman JE, Shapiro AJ, et al. (2015): Clinical Features of Childhood Primary Ciliary Dyskinesia by Genotype and Ultrastructural Phenotype. *Am J Respir Crit Care Med* 191, 316–324

- Davis** SD, Rosenfeld M, Lee H-S, Ferkol TW, Sagel SD, Dell SD, Milla C, Pittman JE, Shapiro AJ, Sullivan KM, et al. (2019): Primary Ciliary Dyskinesia: Longitudinal Study of Lung Disease by Ultrastructure Defect and Genotype. *Am J Respir Crit Care Med* 199, 190–198
- Duquesnoy** P, Escudier E, Vincensini L, Freshour J, Bridoux A-M, Coste A, Deschildre A, de Blic J, Legendre M, Montantin G, et al. (2009): Loss-of-Function Mutations in the Human Ortholog of *Chlamydomonas reinhardtii* ODA7 Disrupt Dynein Arm Assembly and Cause Primary Ciliary Dyskinesia. *The American Journal of Human Genetics* 85, 890–896
- Duriez** B, Duquesnoy P, Escudier E, Bridoux A-M, Escalier D, Rayet I, Marcos E, Vojtek A-M, Bercher J-F, Amselem S (2007): A common variant in combination with a nonsense mutation in a member of the thioredoxin family causes primary ciliary dyskinesia. *PNAS* 104, 3336–3341
- Ferkol** T, Mitchison HM, O’Callaghan C, Leigh M, Carson J, Lie H, Rosenbluth D, Brody SL: Current issues in the basic mechanisms, pathophysiology, diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia. In: Frey U, Gerritsen J (Hrsg.): *Respiratory Diseases in Infants and Children*. European Respiratory Society 2006, 291–313
- Ferrante** MI, Feather SA, Bulfone A, Wright V, Ghiani M, Selicorni A, Gammaro L, Scolari F, Woolf AS, Sylvie O, et al. (2001): Identification of the Gene for Oral-Facial-Digital Type I Syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 68, 569–576
- Frommer** A, Hjejij R, Loges NT, Edelbusch C, Jahnke C, Raidt J, Werner C, Wallmeier J, Große-Onnebrink J, Olbrich H, et al. (2015): Immunofluorescence Analysis and Diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia with Radial Spoke Defects. *Am J Respir Cell Mol Biol* 53, 563–573
- Gärtig** S, Konietzko N (2006): Primäre ziliare Dyskinesie. *Der Pneumologe* 3, 364–371
- Grasemann** H, Schwiertz R, Matthiesen S, Racké K, Ratjen F (2005): Increased Arginase Activity in Cystic Fibrosis Airways. *Am J Respir Crit Care Med* 172, 1523–1528
- Gremmo** M, Guenza M (1999): Positive expiratory pressure in the physiotherapeutic management of primary ciliary dyskinesia in paediatric age. - Abstract - Europe PMC. *Monaldi Archives for Chest Disease = Archivio Monaldi per le Malattie del Torace* 54, 255–257

- Habermacher** G, Sale WS (1997): Regulation of Flagellar Dynein by Phosphorylation of a 138-kD Inner Arm Dynein Intermediate Chain. *J Cell Biol* 136, 167–176
- Hamasaki** T, Nielson JH, Satir P (1998): Regulation of Outer Arm Dynein Activity via Light Chain Phosphorylation.
- Hesse** H, Mizera W, Kasperek R, Konietzko N, Maassen DW (1981): Eine Methode zur Messung der Ziliarfrequenz aus Biirstenbiopsien der menschlichen Bronchialschleimhaut. *Klinische Wochenschrift* 135–140
- Hirst** RA, Jackson CL, Coles JL, Williams G, Rutman A, Goggin PM, Adam EC, Page A, Evans HJ, Lackie PM, et al. (2014): Culture of Primary Ciliary Dyskinesia Epithelial Cells at Air-Liquid Interface Can Alter Ciliary Phenotype but Remains a Robust and Informative Diagnostic Aid. *PLoS ONE* 9, e89675
- Hjeij** R, Onoufriadis A, Watson CM, Slagle CE, Klena NT, Dougherty GW, Kurkowiak M, Loges NT, Diggle CP, Morante NFC, et al. (2014): CCDC151 Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia by Disruption of the Outer Dynein Arm Docking Complex Formation. *The American Journal of Human Genetics* 95, 257–274
- Ho** JC, Chan KN, Hu WH, Lam WK, Zheng L, Tipoe GL, Sun J, Leung R, Tsang KW (2001): The Effect of Aging on Nasal Mucociliary Clearance, Beat Frequency, and Ultrastructure of Respiratory Cilia. *Am J Respir Crit Care Med* 163, 983–988
- Höben** IM, Hjeij R, Olbrich H, Dougherty GW, Nöthe-Menchen T, Aprea I, Frank D, Pennekamp P, Dworniczak B, Wallmeier J, et al. (2018): Mutations in C11orf70 Cause Primary Ciliary Dyskinesia with Randomization of Left/Right Body Asymmetry Due to Defects of Outer and Inner Dynein Arms. *The American Journal of Human Genetics* 102, 973–984
- Horani** A, Druley TE, Zariwala MA, Patel AC, Levinson BT, Van Arendonk LG, Thornton KC, Giacalone JC, Albee AJ, Wilson KS, et al. (2012): Whole-Exome Capture and Sequencing Identifies HEATR2 Mutation as a Cause of Primary Ciliary Dyskinesia. *The American Journal of Human Genetics* 91, 685–693
- Horani** A, Brody SL, Ferkol TW, Shoseyov D, Wasserman MG, Ta-shma A, Wilson KS, Bayly PV, Amirav I, Cohen-Cymberknoh M, et al. (2013a): CCDC65 Mutation Causes Primary Ciliary Dyskinesia with Normal Ultrastructure and Hyperkinetic Cilia. *PLOS ONE* 8, e72299
- Horani** A, Ferkol TW, Shoseyov D, Wasserman MG, Oren YS, Kerem B, Amirav I, Cohen-Cymberknoh M, Dutcher SK, Brody SL, et al. (2013b): LRRC6 Mutation

- Causes Primary Ciliary Dyskinesia with Dynein Arm Defects. *PLOS ONE* 8, e59436
- Horn F**, Moc I, Ziegler P, Berghold S: Mikrotubuli. In: *Biochemie des Menschen: das Lehrbuch für das Medizinstudium*. 7., korrigierte Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York 2019, 492–494
- Horvath I** (2003): Comparison of exhaled and nasal nitric oxide and exhaled carbon monoxide levels in bronchiectatic patients with and without primary ciliary dyskinesia. *Thorax* 58, 68–72
- Hyndman RJ**, Fan Y (1996): Sample Quantiles in Statistical Packages. *The American Statistician* 50, 361–365
- Ibañez-Tallon I**, Pagenstecher A, Fliegauf M, Olbrich H, Kispert A, Ketelsen U-P, North A, Heintz N, Omran H (2004): Dysfunction of axonemal dynein heavy chain Mdnah5 inhibits ependymal flow and reveals a novel mechanism for hydrocephalus formation. *Human Molecular Genetics* 13, 2133–2141
- Jackson CL**, Behan L, Collins SA, Goggin PM, Adam EC, Coles JL, Evans HJ, Harris A, Lackie P, Packham S, et al. (2016): Accuracy of diagnostic testing in primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J* 47, 837–848
- Jeanson L**, Copin B, Papon J-F, Dastot-Le Moal F, Duquesnoy P, Montantin G, Cadranel J, Corvol H, Coste A, Désir J, et al. (2015): RSPH3 Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia with Central-Complex Defects and a Near Absence of Radial Spokes. *The American Journal of Human Genetics* 97, 153–162
- Jorissen M**, Bessems A (1995): Influence of culture duration and ciliogenesis on the relationship between ciliary beat frequency and temperature in nasal epithelial cells. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 252, 451–454
- Jorissen M**, Willems T, Schueren BVD (1998): Nasal ciliary beat frequency is age independent. *The Laryngoscope* 108, 1042–1047
- Jung A**, Geidel C, Moeller A (2011): Nasal NO measurement in preschool children: feasibility and validation of a tidal breathing technique via a resistance tube. 33. Jahrestagung der Gesellschaft für pädiatrische Pneumologie, Graz
- Kartagener M** (1933): Zur Pathogenese der Bronchiektasien. I. Mitteilung Bronchiektasien bei situs viscerum inversus. *Beitr Klin Tuberk* 83, 498–501
- Keck T**, Leiacker R, Riechelmann H, Rettinger G (2000): Temperature Profile in the Nasal Cavity. *The Laryngoscope* 110, 651–654

- Kispert A**, Petry M, Olbrich H, Volz A, Ketelsen U, Horvath J, Melkaoui R, Omran H, Zariwala M, Noone P, Knowles M (2003): Genotype-phenotype correlations in PCD patients carrying DNAH5 mutations. *Thorax* 58, 552–554
- Knowles**, Daniels LA, Davis SD, Zariwala MA, Leigh MW (2013): Primary Ciliary Dyskinesia. Recent Advances in Diagnostics, Genetics, and Characterization of Clinical Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 188, 913–922
- Knowles MR**, Ostrowski LE, Loges NT, Hurd T, Leigh MW, Huang L, Wolf WE, Carson JL, Hazucha MJ, Yin W, et al. (2013): Mutations in SPAG1 Cause Primary Ciliary Dyskinesia Associated with Defective Outer and Inner Dynein Arms. *The American Journal of Human Genetics* 93, 711–720
- Kott E**, Legendre M, Copin B, Papon J-F, Dastot-Le Moal F, Montantin G, Duquesnoy P, Piterboth W, Amram D, Bassinet L, et al. (2013): Loss-of-Function Mutations in RSPH1 Cause Primary Ciliary Dyskinesia with Central-Complex and Radial-Spoke Defects. *The American Journal of Human Genetics* 93, 561–570
- Kuehni CE**, Frischer T, Strippoli M-PF, Maurer E, Bush A, Nielsen KG, Escibano A, Lucas JSA, Yiallourous P, Omran H, et al. (2010): Factors influencing age at diagnosis of primary ciliary dyskinesia in European children. *European Respiratory Journal* 36, 1248–1258
- Lee SS**, Jung IH, Mo JH, Yoo CG, Lee CH, Yi WJ, Rhee CS (2004): Ciliary Beat Frequency in the Airways of Humans : Influences of Lidocaine, Age, Sex and Smoking. *Journal of Rhinology* 11, 12–17
- Leigh MW**, Pittman JE, Carson JL, Ferkol TW, Dell SD, Davis SD, Knowles MR, Zariwala MA (2009): Clinical and genetic aspects of primary ciliary dyskinesia/Kartagener syndrome. *Genetics in Medicine* 11, 473–487
- Leigh MW**, Hazucha MJ, Chawla KK, Baker BR, Shapiro AJ, Brown DE, LaVange LM, Horton BJ, Qaqish B, Carson JL, et al. (2013): Standardizing Nasal Nitric Oxide Measurement as a Test for Primary Ciliary Dyskinesia. *Annals ATS* 10, 574–581
- Lindemann J**, Leiacker R, Rettinger G, Keck T (2002): Nasal mucosal temperature during respiration. *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences* 27, 135–139
- Lindemann J**, Keck T, Scheithauer MO, Leiacker R, Wiesmiller K (2007): Nasal Mucosal Temperature in Relation to Nasal Airflow as Measured by Rhinomanometry. *American Journal of Rhinology* 21, 46–49

- Linke W**, Pfitzer G: Leben ist Bewegung. In: Brandes R, Lang F, Schmidt RF (Hrsg.): Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie (Springer-Lehrbuch). Springer, Berlin, Heidelberg 2019, 123–130
- Loges NT**, Olbrich H, Fenske L, Mussaffi H, Horvath J, Fliegauf M, Kuhl H, Baktai G, Peterffy E, Chodhari R, et al. (2008): DNAI2 Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia with Defects in the Outer Dynein Arm. The American Journal of Human Genetics 83, 547–558
- Loges NT**, Olbrich H, Becker-Heck A, Häffner K, Heer A, Reinhard C, Schmidts M, Kispert A, Zariwala MA, Leigh MW, et al. (2009): Deletions and Point Mutations of LRRC50 Cause Primary Ciliary Dyskinesia Due to Dynein Arm Defects. The American Journal of Human Genetics 85, 883–889
- Lucas J**, Barbato A, Collins S, Goutaki M, Behan L, Caudri D, Dell S, Eber E, Escudier E, Hirst R, et al. (2017): ERS Task Force guideline for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. Eur Respir J 49
- Madsen A**, Green K, Buchvald F, Hanel B, Nielsen KG (2013): Aerobic Fitness in Children and Young Adults with Primary Ciliary Dyskinesia. PLOS ONE 8, e71409
- Majithia A**, Fong J, Hariri M, Harcourt J (2005): Hearing outcomes in children with primary ciliary dyskinesia—a longitudinal study. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology 69, 1061–1064
- Marthin JK**, Petersen N, Skovgaard LT, Nielsen KG (2010): Lung Function in Patients with Primary Ciliary Dyskinesia: A Cross-Sectional and 3-Decade Longitudinal Study. Am J Respir Crit Care Med 181, 1262–1268
- Mazor M**, Alkrinawi S, Chalifa-Caspi V, Manor E, Sheffield VC, Aviram M, Parvari R (2011): Primary Ciliary Dyskinesia Caused by Homozygous Mutation in DNAL1, Encoding Dynein Light Chain 1. The American Journal of Human Genetics 88, 599–607
- McGrath J**, Somlo S, Makova S, Tian X, Brueckner M (2003): Two Populations of Node Monocilia Initiate Left-Right Asymmetry in the Mouse. Cell 114, 61–73
- Merveille A-C**, Davis EE, Becker-Heck A, Legendre M, Amirav I, Bataille G, Belmont J, Beydon N, Billen F, Clément A, et al. (2011): CCDC39 is required for assembly of inner dynein arms and the dynein regulatory complex and for normal ciliary motility in humans and dogs. Nat Genet 43, 72–78
- Mitchison HM**, Schmidts M, Loges NT, Freshour J, Dritsoula A, Hirst RA, O’Callaghan C, Blau H, Dabbagh MA, Olbrich H, et al. (2012): Mutations in

- axonemal dynein assembly factor DNAAF3 cause primary ciliary dyskinesia. *Nat Genet* 44, 381–389
- Möller** W, Häußinger K, Ziegler-Heitbrock L, Heyder J (2006): Mucociliary and long-term particle clearance in airways of patients with immotile cilia. *Respiratory Research* 7, 10
- Moore** A, Escudier E, Roger G, Tamalet A, Pelosse B, Marlin S, Clément A, Geremek M, Delaisi B, Bridoux A-M, et al. (2006): RPGR is mutated in patients with a complex X linked phenotype combining primary ciliary dyskinesia and retinitis pigmentosa. *Journal of Medical Genetics* 43, 326–333
- Munro** NC, Currie DC, Lindsay KS, Ryder TA, Rutman A, Dewar A, Greenstone MA, Hendry WF, Cole PJ (1994): Fertility in men with primary ciliary dyskinesia presenting with respiratory infection. *Thorax* 49, 684–687
- Narang** I, Ersu R, Wilson NM, Bush A (2002): Nitric oxide in chronic airway inflammation in children: diagnostic use and pathophysiological significance. *Thorax* 586–589
- Noone** PG, Bali D, Carson JL, Sannuti A, Gipson CL, Ostrowski LE, Bromberg PA, Boucher RC, Knowles MR (1999): Discordant organ laterality in monozygotic twins with primary ciliary dyskinesia. *American Journal of Medical Genetics* 82, 155–160
- Noone** PG, Leigh MW, Sannuti A, Minnix SL, Carson JL, Hazucha M, Zariwala MA, Knowles MR (2004): Primary Ciliary Dyskinesia. *Am J Respir Crit Care Med* 169, 459–467
- Nüßlein** T, Brinkmann F, Ahrens P, Ebsen M, Jung A, Kirchberger W, Kneißl A, Koerner-Rettberg C, Linz-Keul H, Loges NT, et al. (2013): Diagnostik der primären ziliären Dyskinesie: Empfehlungen in Zusammenarbeit mit Kartagener-Syndrom und Primäre Ciliäre Dyskinesie e. V. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 161, 406–416
- O’Callaghan** C, Smith K, Wilkinson M, Morgan D, Priftis K (1991): Ciliary beat frequency in newborn infants. *Arch Dis Child* 66, 443–444
- O’Callaghan** C, Chilvers M, Hogg C, Bush A, Lucas J (2007): Diagnosing primary ciliary dyskinesia. *Thorax* 62, 656–657
- Okada** Y, Takeda S, Tanaka Y, Belmonte J-CI, Hirokawa N (2005): Mechanism of Nodal Flow: A Conserved Symmetry Breaking Event in Left-Right Axis Determination. *Cell* 121, 633–644

- Olbrich** H, Häffner K, Kispert A, Völkel A, Volz A, Sasmaz G, Reinhardt R, Hennig S, Lehrach H, Konietzko N, et al. (2002): Mutations in DNAH5 cause primary ciliary dyskinesia and randomization of left–right asymmetry. *Nat Genet* 30, 143–144
- Olbrich** H, Schmidts M, Werner C, Onoufriadis A, Loges NT, Raidt J, Banki NF, Shoemark A, Burgoyne T, Al Turki S, et al. (2012): Recessive HYDIN Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia without Randomization of Left-Right Body Asymmetry. *The American Journal of Human Genetics* 91, 672–684
- Olbrich** H, Cremers C, Loges NT, Werner C, Nielsen KG, Marthin JK, Philipsen M, Wallmeier J, Pennekamp P, Menchen T, et al. (2015): Loss-of-Function GAS8 Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia and Disrupt the Nexin-Dynein Regulatory Complex. *The American Journal of Human Genetics* 97, 546–554
- Omran** H (2005): Genetische Defekte bei primärer ziliärer Dyskinesie. *Monatsschr Kinderheilkd* 153, 246–254
- Omran** H, Frischer T: Primäre ziliäre Dyskinesie. In: von Mutius E, Gappa M, Eber E, Frey U (Hrsg.): *Pädiatrische Pneumologie*. 3. Auflage; Springer Verlag, Heidelberg 2013, 641–645
- Omran** H, Kobayashi D, Olbrich H, Tsukahara T, Loges NT, Hagiwara H, Zhang Q, Leblond G, O’Toole E, Hara C, et al. (2008): Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins. *Nature* 456, 611–616
- Onoufriadis** A, Paff T, Antony D, Shoemark A, Micha D, Kuyt B, Schmidts M, Petridi S, Dankert-Roelse JE, Haarman EG, et al. (2013): Splice-Site Mutations in the Axonemal Outer Dynein Arm Docking Complex Gene CCDC114 Cause Primary Ciliary Dyskinesia. *The American Journal of Human Genetics* 92, 88–98
- Onoufriadis** A, Shoemark A, Munye MM, James CT, Schmidts M, Patel M, Rosser EM, Bacchelli C, Beales PL, Scambler PJ, et al. (2014): Combined exome and whole-genome sequencing identifies mutations in ARMC4 as a cause of primary ciliary dyskinesia with defects in the outer dynein arm. *Journal of Medical Genetics* 51, 61–67
- Panizzi** JR, Becker-Heck A, Castleman VH, Al-Mutairi DA, Liu Y, Loges NT, Pathak N, Austin-Tse C, Sheridan E, Schmidts M, et al. (2012): CCDC103 mutations cause primary ciliary dyskinesia by disrupting assembly of ciliary dynein arms. *Nat Genet* 44, 714–719
- Papon** JF, Coste A, Roudot-Thoraval F, Boucherat M, Roger G, Tamalet A, Vojtek AM, Amselem S, Escudier E (2010): A 20-year experience of electron micros-

- copy in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *European Respiratory Journal* 35, 1057–1063
- Papon** J-F, Bassinet L, Cariou-Patron G, Zerah-Lancner F, Vojtek A-M, Blanchon S, Crestani B, Amselem S, Coste A, Housset B, et al. (2012): Quantitative analysis of ciliary beating in primary ciliary dyskinesia: a pilot study. 11
- Pennarun** G, Escudier E, Chapelin C, Bridoux A-M, Cacheux V, Roger G, Clément A, Goossens M, Amselem S, Duriez B (1999): Loss-of-Function Mutations in a Human Gene Related to *Chlamydomonas reinhardtii* Dynein IC78 Result in Primary Ciliary Dyskinesia. *The American Journal of Human Genetics* 65, 1508–1519
- Raidt** J, Wallmeier J, Hjej R, Onnebrink JG, Pennekamp P, Loges NT, Olbrich H, Häffner K, Dougherty GW, Omran H, Werner C (2014): Ciliary beat pattern and frequency in genetic variants of primary ciliary dyskinesia. *European Respiratory Journal* 44, 1579–1588
- Rosenbaum** JL, Cole DG, Diener DR (1999): Intraflagellar Transport: The Eyes Have It. *J Cell Biol* 144, 385–388
- Roth** Y, Baum GL, Aharonson EF, Priel Z, Teichtahl H, Modan M (1991): Human in Vitro Nasal and Tracheal Ciliary Beat Frequencies: Comparison of Sampling Sites, Combined Effect of Medication, and Demographic Relationships. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 100, 378–384
- Rubbo** B, Shoemark A, Jackson CL, Hirst R, Thompson J, Hayes J, Frost E, Copeland F, Hogg C, O’Callaghan C, et al. (2019): Accuracy of High-Speed Video Analysis to Diagnose Primary Ciliary Dyskinesia. *Chest* 155, 1008–1017
- Sanderson** MJ, Dirksen ER, Satir P (1990): Electron microscopy of respiratory tract cilia.
- Satir** P (1974): HOW CILIA MOVE. *Scientific American* 231, 44–54
- Satir** P, Christensen ST (2007): Overview of Structure and Function of Mammalian Cilia. *Annu Rev Physiol* 69, 377–400
- Scholey** JM (2008): Intraflagellar transport motors in cilia: moving along the cell’s antenna. *J Cell Biol* 180, 23–29
- Schwabe** GC, Hoffmann K, Loges NT, Birker D, Rossier C, Santi MM de, Olbrich H, Fliegauf M, Failly M, Liebers U, et al. (2008): Primary ciliary dyskinesia associated with normal axoneme ultrastructure is caused by DNAH11 mutations. *Human Mutation* 29, 289–298

- Shah** A, Shoemark A, MacNeill SJ, Bhaludin B, Rogers A, Bilton D, Hansell DM, Wilson R, Loebinger MR (2016): A longitudinal study characterising a large adult primary ciliary dyskinesia population. *Eur Respir J* 48, 441–450
- Shapiro** AJ, Davis SD, Ferkol T, Dell SD, Rosenfeld M, Olivier KN, Sagel SD, Milla C, Zariwala MA, Wolf W, et al. (2014): Laterality Defects Other Than Situs Inversus Totalis in Primary Ciliary Dyskinesia: Insights Into Situs Ambiguus and Heterotaxy. *Chest* 146, 1176–1186
- Shapiro** AJ, Zariwala MA, Ferkol T, Davis SD, Sagel SD, Dell SD, Rosenfeld M, Olivier KN, Milla C, Daniel SJ, et al. (2016): Diagnosis, monitoring, and treatment of primary ciliary dyskinesia: PCD foundation consensus recommendations based on state of the art review. *Pediatric Pulmonology* 51, 115–132
- Sisson** JH, Stoner JA, Ammons BA, Wyatt TA (2003): All-digital image capture and whole-field analysis of ciliary beat frequency. *Journal of Microscopy* 211, 103–111
- Smith** CM, Hirst RA, Bankart MJ, Jones DW, Easton AJ, Andrew PW, O’Callaghan C (2011): Cooling of Cilia Allows Functional Analysis of the Beat Pattern for Diagnostic Testing. *Chest* 140, 186–190
- Sommer** JU, Gross S, Hörmann K, Stuck BA (2010): Time-dependent changes in nasal ciliary beat frequency. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 267, 1383–1387
- Stannard** WA, Chilvers MA, Rutman AR, Williams CD, O’Callaghan C (2010): Diagnostic Testing of Patients Suspected of Primary Ciliary Dyskinesia. *Am J Respir Crit Care Med* 181, 307–314
- Svedbergh** B, Jonsson V, Afzelius B (1981): Immotile-cilia syndrome and the cilia of the eye. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 215, 265–272
- Tarkar** A, Loges NT, Slagle CE, Francis R, Dougherty GW, Tamayo JV, Shook B, Cantino M, Schwartz D, Jahnke C, et al. (2013): DYX1C1 is required for axonemal dynein assembly and ciliary motility. *Nature Genetics* 45, 995–1003
- Thomas** B, Rutman A, O’Callaghan C (2009): Disrupted ciliated epithelium shows slower ciliary beat frequency and increased dyskinesia. *European Respiratory Journal* 34, 401–404
- Van Der Baan** S, Veerman AJP, Wulffraat N, Bezemer PD, Feenstra L (1986): Primary Ciliary Dyskinesia: Ciliary Activity. *Acta Oto-Laryngologica* 102, 274–281
- Walker** WT, Jackson CL, Lackie PM, Hogg C, Lucas JS (2012): Nitric oxide in primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J* 40, 1024–1032

- Wallmeier J**, Al-Mutairi DA, Chen C-T, Loges NT, Pennekamp P, Menchen T, Ma L, Shamseldin HE, Olbrich H, Dougherty GW, et al. (2014): Mutations in CCNO result in congenital mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nature Genetics* 46, 646–651
- Wargo MJ**, Smith EF (2003): Asymmetry of the central apparatus defines the location of active microtubule sliding in *Chlamydomonas* flagella. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 137–142
- Weller RO**, Kida S, Zhang E-T (1992): Pathways of Fluid Drainage from the Brain - Morphological Aspects and Immunological Significance in Rat and Man. *Brain Pathology* 2, 277–284
- Wessels MW**, Hollander NS den, Willems PJ (2003): Mild fetal cerebral ventriculomegaly as a prenatal sonographic marker for Kartagener syndrome. *Prenatal Diagnosis* 23, 239–242
- Wirschell M**, Olbrich H, Werner C, Tritschler D, Bower R, Sale WS, Loges NT, Pennekamp P, Lindberg S, Stenram U, et al. (2013): The nexin-dynein regulatory complex subunit DRC1 is essential for motile cilia function in algae and humans. *Nature Genetics* 45, 262–268
- Wodehouse T**, Kharitonov SA, Mackay IS, Barnes PJ, Wilson R, Cole PJ (2003): Nasal nitric oxide measurements for the screening of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J* 21, 43–47
- Zariwala MA**, Gee HY, Kurkowiak M, Al-Mutairi DA, Leigh MW, Hurd TW, Hjeij R, Dell SD, Chaki M, Dougherty GW, et al. (2013): ZMYND10 Is Mutated in Primary Ciliary Dyskinesia and Interacts with LRRC6. *The American Journal of Human Genetics* 93, 336–345
- Zhou H**, Wang X, Brighton L, Hazucha M, Jaspers I, Carson JL (2009): INCREASED NASAL EPITHELIAL CILIARY BEAT FREQUENCY ASSOCIATED WITH LIFESTYLE TOBACCO SMOKE EXPOSURE. *Inhal Toxicol* 21, 875–881
- Childs G. <http://cytochemistry.net/cell-biology/cilia.htm>; Zugriff am 04.09.2019
- Fachinformation Amitriptylin. https://portal.dimdi.de/amis-off/servlet/FlowController/Documents-display#__DEFANCHOR__; Zugriff am 13.05.2020
- Fachinformation L-Thyroxin. https://portal.dimdi.de/amis-off/servlet/FlowController/Documents-display#__DEFANCHOR__; Zugriff am 12.05.2020

Fachinformation Modafinil. https://portal.dimdi.de/amis-off/servlet/FlowController/Documents-display#__DEFANCHOR__; Zugriff am 13.05.2020

Fachinformation Ramipril. https://portal.dimdi.de/amis-off/servlet/FlowController/Documents-display#__DEFANCHOR__; Zugriff am 13.05.2020

Fachinformation Rituximab. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/mabthera-epar-product-information_en.pdf; Zugriff am 13.05.2020

Omran H. <https://www.medizin.uni-muenster.de/pcd/unterlagen/studienunterlagen-pcd-und-lateralisationsdefekte/>; Zugriff am 09.10.2019

8 Anhang



Philipps-Universität - Fachbereich Medizin - 35033 Marburg

Fachbereich Medizin

Klinik für Kinder- und
Jugendmedizin
Kinder-Pneumologie/
Kinder-Schlafmedizin

PD Dr. Wilfried Nikolaizik

Tel.: 06421 58 6 2650
06421 58 6 4400
E-Mail: nikolaiz@med.uni-marburg.de

Anschrift: Baldingerstrasse
35043 Marburg

Web: www.ukgm.de/ugm_2/deu/umr_kjm/23741.html

Probandeninformation zur Studie

„Etablierung von Normwerten für die Schlagfrequenz von Zilien mit Hilfe der High-Speed Video Analyse“

Sehr geehrte/r Studienteilnehmer/in,

mit diesem Schreiben möchten wir Sie bitten, dass Sie an der oben genannten Studie, die derzeit in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin am Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg, durchgeführt wird, teilnehmen und wollen Ihnen im Folgenden Informationen dazu geben. Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig. *Sie können jederzeit ohne Angabe von Gründen Ihre einmal gegebene Zustimmung zurückziehen, ohne dass dies für Sie Nachteile hat. Ebenso hat die Entscheidung, nicht an der Studie teilzunehmen, keinerlei Nachteile für Sie.*

Wir werden Sie zusätzlich in einem Aufklärungsgespräch über diese Studie informieren.

Hintergrund

Bei der Ziliendysfunktion handelt es sich um eine Gruppe vererbbarer Erkrankungen von Flimmerhaaren in den Atemwegen. *Die Oberfläche der Atemwege ist mit beweglichen, haarähnlichen Gebilden (Flimmerhaare, Zilien) besetzt, die Schadstoffe (z. B. Staub, Pollen, Bakterien) durch eine schlagende Bewegung wegtransportieren. Wenn die Flimmerhaare nicht richtig schlagen, ist die Reinigung der Atemwege gestört, so dass es zu immer wiederkehrenden Infektionen kommen kann.* Die Diagnose kann durch eine Untersuchung von Flimmerhaaren aus der Nasenschleimhaut gestellt werden. Diese Untersuchung ist technisch anspruchsvoll und wird nur in wenigen spezialisierten Zentren in Deutschland durchgeführt. Wir wollen diese Untersuchung auch in der Universitätskinderklinik Marburg anbieten. In der geplanten Untersuchung sollen zunächst eigene Normwerte für die Schlagfrequenz der Flimmerhaare von gesunden Probanden ermittelt werden. Hierzu sollen Schleimhautzellen mit einer Nasenbürstung gewonnen und mit einer speziellen mikroskopischen Technik (High-Speed

Einverständniserklärung zur Studie

„Etablierung von Normwerten für die Schlagfrequenz von Zilien mit Hilfe der High-Speed Video Analyse“

Probandencode

Ich, (Name des Probanden),
 wurde vom zuständigen Arzt vollständig über Wesen, Bedeutung und Tragweite der Studie mit dem o.g. Titel aufgeklärt. Ich habe den Aufklärungstext gelesen und verstanden. Ich hatte die Möglichkeit, Fragen zu stellen, habe die Antworten verstanden und akzeptiere sie. Der Arzt hat mich über die mit der Teilnahme an der Studie verbundenen Risiken und den möglichen Nutzen informiert.

Ich hatte ausreichend Zeit, mich zur Teilnahme an dieser Studie zu entscheiden und weiß, dass diese freiwillig ist. Ich weiß, dass ich jederzeit und ohne Angabe von Gründen diese Zustimmung widerrufen kann, ohne dass dieser Entschluss einen Nachteil ergibt.

Mir ist bekannt, dass meine persönlichen Daten in verschlüsselter Form gespeichert werden.

Ich habe eine Kopie der Probandeninformation und dieser Einwilligungserklärung erhalten. Ich erkläre hiermit die freiwillige Teilnahme an dieser klinischen Studie.

.....
 Ort und Datum (eigenhändig) Unterschrift Proband (eigenhändig)

.....
 Ort und Datum Unterschrift des aufklärenden Arztes

Version 4.0 vom 08.03.2018

Abbildung 21: Einverständniserklärung Probanden

Fragebogen Probanden zur Studie

„Etablierung von Normwerten für die Schlagfrequenz von Zilien mit Hilfe der High-Speed Video Analyse“

Damit Sie für die Studie als Proband in Frage kommen, müssen wir Vorerkrankungen und Störfaktoren ausschließen. Bitte füllen Sie deshalb folgenden Fragebogen vollständig aus.

Probanden-ID: _____
Name: _____
Vorname: _____
Geb.-Datum: _____
Untersuchungs-Datum: _____

Trifft zu Trifft nicht zu

Leiden Sie an einer chronischen Lungenerkrankung?

Leiden Sie an einer Allergie?

Haben Sie zurzeit einen akuten Infekt?

Rauchen Sie?

Nehmen Sie regelmäßig Medikamente?

Wenn ja, welche Medikamente? _____

.....
Ort und Datum

.....
Unterschrift Proband

Version 2.0 vom 19.04.2018

Abbildung 22: Fragebogen Probanden

Tabelle 12: Inhaltsangabe RPMI Medium 1640

	Components	Concentration (mg/L)
Amino Acids	Glycine	10.0
	L-Arginine	200.0
	L-Asparagine	50.0
	L-Aspartic acid	20.0
	L-Cystine	20.0
	L-Glutamic Acid	20.0
	L-Glutamine	300.0
	L-Histidine	15.0
	L-Hydroxyproline	20.0
	L-Isoleucine	50.0
	L-Leucine	50.0
	L-Lysine hydrochloride	40.0
	L-Methionine	15.0
	L-Phenylalanine	15.0
	L-Proline	20.0
	L-Serine	30.0
	L-Threonine	20.0
	L-Tryptophan	5.0
	L-Tyrosine	20.0
	L-Valine	20.0
Vitamins	Biotin	0.2
	Choline chloride	3.0
	D-Calcium pantothenate	0.25
	Folic Acid	1.0
	Niacinamide	1.0
	Para-Aminobenzoic Acid	1.0
	Pyridoxine hydrochloride	1.0
	Riboflavin	0.2
	Thiamine hydrochloride	1.0
	Vitamin B12	0.005
Inorganic Salts	i-Inositol	35.0
	Calcium nitrate (Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O)	100.0
	Magnesium Sulfate (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	100.0
	Potassium Chloride (KCl)	400.0
	Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	2000.0
	Sodium Chloride (NaCl)	5500.0
Other Components	Sodium Phosphate dibasic (Na ₂ HPO ₄) anhydrous	800.0
	D-Glucose (Dextrose)	2000.0
	Glutathione (reduced)	1.0
	HEPES	5958.0
	Phenol Red	5.0

9 Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen

Meine akademischen Lehrenden in Marburg waren:

Adamkiewicz	Eberhart	Klaus
Balz	Fendrich	Köhler U.
Barth	Feuser	Köhler S.
Bartsch	Frink	König
Bauer	Fritz	Kolb-Niemann
Baum	Fuchs-Winkelmann	Koolmann
Becker A.	Geks	Krieg
Becker S.	Göbert	Kruse
Bender	Görg	Kühnert
Berger	Gress	Leonhardt
Bertoune	Grosse	Lill
Bette	Grundmann	Lohoff
Bien	Hegele	Luster
Bösner	Hertl	Mahnken
Bonaterrea	Hildebrand	Maier
Braun	Höffken	Maisner
Brehm	Hofmann	Milani
Bücking	Holst	Mirow
Burchert	Hoyer	Moll
Cetin	Hundt	Moosdorf
Czubayko	Jansen	Mueller
Daut	Jerrentrup	Mutters
Decher	Kalder	Neubauer
del Rey	Kampmann	Neumüller
Denkert	Kann	Nikolaizik
Dettmeyer	Kanngießer	Nimsky
Dietz	Kim-Berger	Oberkircher
Dodel	Kinscherf	Oberwinkler
Donner-Banzhoff	Kircher	Oertel
Duda	Kirschbaum	Oliver

Opitz	Tackenberg
Pagenstecher	Thieme
Pankuweit	Timmermann
Patrascan	Timmesfeld
Peter	Vogelmeier
Peterlein	Wagner
Pfützner	Weber
Plant	Weihe
Preisig-Müller	Westermann
Printz	Wilhelm
Quint	Worzfeld
Reese	Wrocklage
Renz	Wulf
Rost	Zemlin
Rothmund	
Ruchholtz	
Rust	
Sahmland	
Schäfer	
Schieffer	
Schmeck	
Schu	
Schütz	
Schwarz	
Seipelt	
Seitz	
Sekundo	
Sevinc	
Sommer	
Steininger	
Stuck	
Suske	

10 Danksagung

Ich danke Herrn Priv. Doz. Dr. med. Wilfried Nikolaizik, dem Leiter der Sektion Pädiatrische Pneumologie in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin II des Universitätsklinikums Marburg für die Möglichkeit, meine Promotion an seiner Klinik und im zugehörigen Labor durchzuführen. Ich bedanke mich weiterhin ganz herzlich für die Bereitstellung des Themas und die gute Betreuung mit praktischer Unterstützung während der Untersuchungen sowie Hilfe bei Auswertung und Erstellung dieser Dissertation.

Ich danke Frau Nadine Schalopp und den weiteren Mitarbeitern des Kindernephrologischen Forschungslabors für die freundliche Zurverfügungstellung von Material und Räumlichkeiten sowie die Unterstützung bei der Datenerhebung.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund und meiner Familie für die unbezahlbare Unterstützung und Geduld während meines Studiums und der Erstellung dieser Promotionsarbeit.

In besonderer Weise danke ich natürlich auch allen freiwilligen Probanden, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.